



**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *Leptospira*
PATÓGENA, CIRCULANTE EN UNA POBLACIÓN DE ROEDORES
Y CANINOS PROVENIENTES DE ZONAS DE ALTO RIESGO PARA
INFECCION HUMANA EN LA CIUDAD DE BARRANQUILLA-
COLOMBIA**

MARGARETT CUELLO PÉREZ

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
ÉNFASIS EN ENFERMEDADES TROPICALES
DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DEL NORTE
BARRANQUILLA
COLOMBIA
2011**

**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *Leptospira*
PATÓGENA CIRCULANTE EN UNA POBLACIÓN DE ROEDORES
Y CANINOS PROVENIENTES DE ZONAS DE ALTO RIESGO PARA
INFECCION HUMANA EN LA CIUDAD DE BARRANQUILLA-
COLOMBIA**

MARGARETT CUELLO PÉREZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Enfermedades
Tropicales**

DIRECTORA:

Dra. CLAUDIA ROMERO-VIVAS. PhD

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
ÉNFASIS EN ENFERMEDADES TROPICALES
DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DEL NORTE
BARRANQUILLA
COLOMBIA
2011**

**Aprobado por el profesorado de la
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
en cumplimiento de los requisitos exigidos
para optar el título de Magister en Ciencias
Básicas Biomédicas
con Énfasis en Enfermedades Tropicales**

4.5

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Barranquilla, Marzo de 2011

El anhelo de enfatizar mi carrera profesional en la investigación y que abarcara especialmente el estudio de las enfermedades tropicales nació en el año 2005, mientras me desempeñaba como bacterióloga en el Hospital Lascario Barbosa Avendaño, ubicado en el municipio de Acandí en el departamento de Chocó. Desde entonces todo el camino recorrido para alcanzar la materialización de ese sueño, incluyendo mis renunciaciones y ganancias, desaciertos y victorias, lo quiero dedicar al amor más grande de mi vida:

Mi Señor Jesús, El Rey Eterno

Al Inmaculado Corazón de mi Buena Madre, la Virgen María.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud inmensa a quien me dio la vida, el valor para realizarla y ha estado conmigo siempre: La Santísima Trinidad de Dios. Gracias también a El por regalarme el amor y la protección maternal de la Bienaventurada Virgen María.

A mis aliados en la realización de mis sueños por enseñarme a luchar con lealtad para alcanzar todos mis anhelos; insistiéndome y demostrándome siempre que estos se consiguen con disciplina, perseverancia y mucho, pero mucho trabajo: ellos son mi familia.

A mis tutores: Dra. Claudia Romero-Vivas y Dr. Andrew Keith Falconar por permitirme hacer parte del Grupo de Investigación en Enfermedades Tropicales para la ejecución de este proyecto y compartir conmigo su excelencia académica para mi formación como magíster. Gracias por la ayuda que me ofrecieron en mi momento de austeridad.

A todas las personas que con su aporte en diferentes etapas de esta investigación contribuyeron con la ejecución y culminación favorable del mismo. De forma especial al técnico agropecuario Yimmis de la Hoz, quien participó activamente en toda la expedición de trampeo, realizó la disección de roedores y captura de los perros. Al técnico de la Secretaría de Salud de Barranquilla, Pablo Maldonado por su acompañamiento en el trabajo de campo, participación en la expedición de trampeo y captura de perros.

A los veterinarios Patricia Méndez y Lenzy Miranda por la asesoría y participación en el trabajo con perros y roedores respectivamente.

A las instituciones que fueron fundamentales para llevar a cabo este proyecto de investigación: Colciencias por la financiación del proyecto N°1215-408-20551 aprobado a la Dra. Claudia Romero y la Secretaría de Salud de Barranquilla por el suministro de datos.

A la Universidad del Norte, al Departamento de Investigaciones y Proyectos (DIP), al coordinador y todo el cuerpo docente de esta Maestría, a los compañeros de la tercera cohorte y a mis compañeros de los laboratorios de investigación, porque también hacen parte de este logro.

A Barranquilla y a la gente de las áreas de estudio por su colaboración y confianza en nuestra labor.

Y a todos los seres que han estado conmigo durante este camino, brindándome su apoyo material y espiritual de manera incondicional: verdaderos amigos, mis hermanos.
A todos, mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
RESUMEN.....	17
Abstract.....	20
1.0. Introducción.....	23
2.0. Justificación.....	27
3.0. Marco Teórico.....	35
3.1. Microbiología de <i>Leptospira</i>	37
3.2. Taxonomía de <i>Leptospira</i>	41
3.2.1. Clasificación fenotípica.....	41
3.3. Descripción del modo de transmisión.....	46
3.3.1. Transmisión directa.....	46
3.3.2. Transmisión indirecta.....	46
3.4. Descripción de la patogenia.....	47
3.5. Breve descripción de la leptospirosis en humanos.....	49
3.6. Leptospirosis en animales.....	50
3.6.1. Leptospirosis aguda en perros.....	53
3.6.2. Leptospirosis crónica en perros.....	55
3.7. Pruebas de laboratorio empleadas para el diagnóstico de leptospirosis.....	56
3.7.1. Diagnóstico con métodos directos.....	56

3.7.1.1. Microscopía de campo oscuro.....	56
3.7.1.2. Aislamiento bacteriano.....	57
3.7.1.3. Métodos de Tinción.....	58
3.7.1.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	59
3.7.2. Diagnóstico con métodos indirectos.....	59
3.7.2.1. ELISA.....	60
3.7.2.2. Microaglutinación Microscópica (MAT).....	60
3.7.2.3. Inmunofluorescencia.....	62
3.7.3. Diagnóstico diferencial en animales.....	62
3.8. Tratamiento y control.....	63
3.9. Inmunización.....	64
4.0. Leptospirosis en Colombia.....	65
5.0. Objetivos.....	71
5.1. Objetivo general.....	71
5.2. Objetivos específicos.....	71
6.0. Materiales y métodos.....	73
6.1. Tipo de estudio.....	73
6.2. Área de estudio.....	73
6.3. Población de estudio.....	76
6.3.1. Población de roedores.....	77
6.3.2. Población canina.....	78
6.4. Trabajo de campo.....	78

6.4.1.Captura de roedores.....	78
6.4.2. Captura de perros.....	83
6.5. Obtención de muestras.....	86
6.5.1.Obtención de muestras en roedores.....	86
6.5.2.Obtención de muestras en caninos.....	88
6.6.Cultivo de muestras biológicas.....	91
6.6.1.Preparación de los medios de cultivo.....	91
6.6.2.Cultivo de muestras en roedores.....	93
6.6.3. Urocultivo en caninos.....	94
6.7.Determinación de la presencia de <i>Leptospira</i> patógena en las muestras animales y en el aislamiento.....	96
6.7.1. Extracción de ADN en roedores y caninos.....	96
6.7.2. Reacción en cadena de la Polimerasa.....	99
6.7.3. Gel de agarosa y determinación de la banda de 423pb.....	100
6.8.Realización de pruebas inmunológicas.....	101
6.8.1. Realización de la Pruebas de Microaglutinación (MAT).....	101
6.8.2. MAT en roedores y perros.....	103
6.9. Contribución al conocimiento de la enfermedad.....	105
6.9.1.Habitantes de las áreas estudiadas.....	105
6.9.2. Congresos, Simposios y encuentros Investigativos.....	106
6.9.3. Autoridades de Salud.....	107
7.0. Consideraciones éticas.....	107
8.0. Análisis de los datos.....	108

9.0.Resultados.....	109
9.1.Áreas de estudio.....	109
9.1.1.Descripción de las áreas y viviendas donde se realizaron las Capturas.....	109
9.1.1.1. Descripción de las viviendas del barrio Las Américas.....	109
9.1.1.2. Descripción de las viviendas del barrio Por Fin.....	113
9.1.1.3. Descripción de las viviendas del barrio Rebolo.....	115
9.2. Capturas.....	117
9.2.1. Población de roedores.....	117
9.2.2. Población canina.....	118
9.3.Cultivos de muestras biológicas.....	120
9.3.1. Cultivos de muestras de riñón de la población de roedores.....	120
9.3.2.Cultivo de muestras de orina en perros.....	121
9.4. Determinación de <i>Leptospira</i> patógena en las muestras animales y el aislamiento mediante ensayos moleculares	122
9.4.1.Resultados en caninos.....	122
9.4.2.Resultados en caninos.....	123
9.5. Prueba de Microaglutinación (MAT).....	125
9.5.1.Resultados de MAT en roedores.....	125
9.5.1.1. Resultados de MAT en roedores por áreas de estudio.....	128
9.5.2. Resultados de MAT en caninos.....	130
9.5.2.1. Resultados de MAT en caninos por áreas de estudio.....	132
9.5.2.1.1. Resultados de MAT en caninos del barrio las Américas.....	132

9.5.2.1.2. Resultados de MAT en caninos del barrio Por Fin.....	132
9.5.2.1.3. Resultados de MAT en caninos del barrio Rebolo.....	133
9.6.Características clínicas encontradas en perros.....	135
9.7. Contribución al conocimiento de la enfermedad.....	136
9.7.1.Habitantes de las áreas estudiadas.....	136
9.7.2. Congresos, Simposios y encuentros investigativos.....	136
9.7.3. Autoridades de salud.....	137
10.0. Discusión.....	138
11.0. Conclusiones.....	152
12.0. Recomendaciones.....	154
BIBLIOGRAFIA.....	156
ANEXOS.....	167

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Serovares de <i>Leptospira</i> Patógena.....	43
Tabla 2.	Clasificación genotípica de las especies de <i>Leptospira</i>	45
Tabla 3.	Reservorios típicos de serovares patógenos.....	51
Tabla 4.	Casos de leptospirosis humana en Barranquilla durante los años 2004, 2005, 2006, 2007, 2008 y 2009.....	70
Tabla 5.	Características físicas para diferenciación de ratas.....	87
Tabla 6.	Serovares utilizados en la prueba MAT.....	102
Tabla 7.	Detalle de la cantidad de ejemplares capturadas durante la expedición de trampeo.....	118
Tabla 8.	Número de perros capturados en las áreas de estudio....	119
Tabla 9.	Panel utilizado en MAT serovar-específica de roedores...	126
Tabla 10.	Prevalencias y serovares patógenos en roedores.....	127
Tabla 11.	Distribución de serovares por especie de roedor en los barrios de estudio.....	128
Tabla 12.	Distribución por barrios de serovares patógenos de <i>Leptospira</i> en la población canina.....	131
Tabla 13.	Frecuencias de síntomas en caninos.....	135

INDICE DE FIGURAS

Fig.1	Ubicación estratégica de Barranquilla como puerto fluvial y marítimo.....	30
Fig.2	Cuenca Hidrográfica de Barranquilla.....	32
Fig.3	Barranquilla durante la época lluviosa.....	33
Fig.4	Panorámica del Puerto de Barranquilla.....	33
Fig.5	<i>Leptospira Interrogans</i> s.l. observada bajo microscopio electrónico de barrido.....	38
Fig.6	Representación de la estructura de membrana en <i>Leptospira</i> .	41
Fig.7	Representación de la estructura de la proteína LipL32.....	48
Fig.8	Modo de transmisión de <i>Leptospira</i>	53
Fig.9	Ubicación de las áreas de estudio en el mapa de Barranquilla.....	75
Fig.10	Detalle de los arroyos que afectan las áreas de Barranquilla incluidas en el estudio.....	75
Fig.11	Áreas de estudio.....	76
Fig.12	Diligenciamiento del consentimiento informado por escrito.....	77
Fig.13	Cebo y trampas utilizadas en la expedición de trampeo.....	79
Fig.14	Sitios estratégicos de trampeo al interior de las viviendas.....	80
Fig.15	Sitios estratégicos de trampeo en los patios de las viviendas...	81

Fig.16	Sitios estratégicos de trampeo en las caballerizas.....	82
Fig.17	Forma de las heces para la identificación de roedores sinantrópicos.....	82
Fig.18	Otros lugares de trampeo.....	83
Fig.19	Captura de caninos en las áreas de estudio.....	84
Fig.20	Forma correcta de capturar perros callejeros para evitar mordeduras.....	85
Fig.21	Examen físico de los perros.....	85
Fig.22	Proceso de obtención de muestras en roedores.....	88
Fig.23	Proceso de obtención de muestras en caninos.....	90
Fig.24	Medio de cultivo EMJH.....	92
Fig.25	Procedimiento para obtención de riñones y cultivo de macerado renal.....	94
Fig.26	Macerado renal para ser sembrado en los medios de cultivo EMJH, EMJH-5'FU.....	94
Fig.27	Cultivo de orina en perros.....	95
Fig.28	Incubación de los cultivos.....	96
Fig.29	Muestras para extracción de ADN genómico.....	98

Fig.30	Reactivos y equipos utilizados para pruebas de Biología molecular.....	98
Fig. 31	Reacción en cadena de la polimerasa.....	100
Fig.32	Detección de productos de amplificación.....	101
Fig.33	Realización de MAT.....	105
Fig.34	Educación a la comunidad.....	106
Fig.35	Charla acerca de roedores.....	106
Fig.36	Barrio Las Américas.....	110
Fig.37	Arroyo en el barrio Las Américas.....	112
Fig.38	Vivienda del paciente fallecido por leptospirosis.....	112
Fig.39	Barrio Por Fin.....	113
Fig.40	Caballeriza situada en una de las áreas de estudio.....	113
Fig.41	Detalle de las viviendas trampeadas.....	114
Fig.42	Viviendas del barrio Rebolo.....	115
Fig.43	Arroyo de Rebolo.....	116
Fig.44	PCR positiva correspondiente al aislamiento de <i>Leptospira</i> patógena (banda de 423 pb).....	123
Fig.45	Roedores positivos por ensayos de PCR.....	123
Fig.46	Caninos positivos por ensayos de PCR.....	124
Fig.47	Determinación de resultados en MAT.....	127

Fig.48	Mapa de serovares patógenos en roedores.....	129
Fig.49	Imagen de MAT positivo en suero canino.....	130
Fig.50	Mapa de serovares patógenos circulando entre caninos.....	134

ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Consentimiento escrito para aceptar colocar trampas de Roedores en la residencia.....	167
Anexo 2. Formulario de inscripción de viviendas trampeadas.....	168
Anexo 3. Formulario de necropsia en roedores.....	169
Anexo 4. Consentimiento escrito para toma de muestras en perros	170
Anexo 5. Información clínica y epidemiológica de perros.....	171
Anexo 6. Resultados generales obtenidos en la prueba MAT con serovares patógenos de <i>Leptospira</i> en roedores.....	172
Anexo 7. Resultados positivos de MAT serovar-específica en la dilución más alta del suero en roedores.....	173
Anexo 8. Resultados generales obtenidos en la prueba de MAT con serovares patógenos de <i>Leptospira</i> en caninos.....	174
Anexo 9. Resultados positivos de MAT serovar-específica en la dilución más alta de sueros caninos.....	175
Anexo10. Artículo publicado en la revista Biomédica año 2009: Serovariedades de <i>Leptospira</i> patógena que afecta a la población canina en áreas de alto riesgo de infección en Barranquilla.....	176

RESUMEN

Objetivo: determinar la prevalencia y los serovares de *Leptospira interrogans* s.l. en roedores y caninos en áreas de Barranquilla, donde se ha registrado altas tasas de incidencia de leptospirosis humana durante los últimos 6 años.

Metodología: se realizó un estudio transversal en tres barrios de la ciudad de Barranquilla (Colombia), donde la Secretaría de Salud Distrital reportó casos de morbilidad y mortalidad humana por leptospirosis. Una descripción general del ambiente en cada área de estudio fue realizada. Muestras de macerados renales (roedores) y orina (perros) fueron colectadas y cultivadas en los medios EMJH, EMJH-5'FU y Fletcher, para intentar aislar *Leptospira interrogans* s.l. Sueros de estos animales fueron colectados y usados para estimar la seroprevalencia, por medio de la prueba de Microaglutinación microscópica (MAT) utilizando 1 serovar saprófito y 24 patógenos. Se aplicó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en cultivos y muestras biológicas para confirmar la presencia de leptospirosis patógenas mediante la amplificación del gen *lipL32*.

Resultados: se capturaron 69 roedores pertenecientes a las especies *M. musculus* (49/69), *R. rattus* (16/69) y *R. norvegicus* (4/69) y 83 perros, desde Noviembre de 2008 a Septiembre de 2009 en los barrios Las Américas, Por Fin y Rebolo, barrios que reunieron las condiciones ambientales que favorecen la transmisión de leptospirosis a animales y humanos. La seroprevalencia para *R.rattus* fue del 12,5% (IC 95% 0-28,7%) y los serovares Grippotyphosa y Jin (serogrupo Serjoe), para *M. musculus* 20,4% (IC 95% 9,1-31,6%) frente a los serovares Grippothyphosa, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Georgia (serogrupo Mini); finalmente para *R. norvegicus* se obtuvo el 25% (IC 95% 0-67%) contra el serovar Bratislava (serogrupo Australis). En *Canis familiaris* la seroprevalencia fue 22,9% (IC 95% 13,9-31,9%), siendo los serovares más prevalentes Icterohaemorrhagiae, Lousiana y Vughia (serogrupo Tarassovi), seguido de Hurstbridge (serogrupo Fainei), Bankinang (serogrupo Autumnalis), Canicola y Grippotyphosa. El mayor número de serovares circulantes se presentó en el barrio Rebolo tanto en roedores como en caninos. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los signos y síntomas observados en los perros y la presencia o no de anticuerpos generados contra *L. interrogans s.l.*, detectados mediante la técnica de MAT. Se obtuvo 1(6,3%) aislamiento de *L. interrogans s.l.* en *R. rattus* (IC 95% 0-18,2) sin embargo, por biología molecular se detectó *Leptospira* patógena en el 12,5% (IC 95% 0-28,7%) de esta especie de roedor y en el 3,7% (IC 95% 0-

8,73%) de los caninos, a partir de muestras de macerados renales y orina respectivamente.

Conclusión: se confirmó la presencia de por lo menos, seis y siete serovares patógenas de *Leptospira interrogans* *sl*, circulantes en la población de roedores y caninos respectivamente, en tres barrios de Barranquilla. Los serovares Icterohaemorrhagiae y Vughia también han sido detectados a partir de muestras de humanos fallecidos en esta ciudad. Además, se evidenció la posible participación de otros animales como caballos, cerdos, vacas y marsupiales como fuentes de infección para roedores y caninos, los cuales conviven con humanos en áreas de alta incidencia de la enfermedad, lo que se suma a la problemática que representa la formación de arroyos durante la época invernal en esta zona de Colombia. Se recomienda, si están disponibles, la adquisición de vacunas que puedan contener los serovares tales como Vughia, Lousiana y Hurstbridge, para la protección de perros y por ende humanos en la ciudad.

Palabras clave: leptospirosis, perros, roedores, áreas urbanas, Microaglutinación, PCR.

ABSTRACT

Objective: to determine the prevalence of *Leptospira interrogans* (s.l.) infections and their serovars in synanthropic rodents and dogs, captured from three study sites in Barranquilla, where human cases of leptospirosis were reported during the previous 6 years.

Methods: a transversal study was carried out in three neighbourhoods of Barranquilla, where human leptospirosis cases were reported by the Secretaria Distrital de Salud. General environmental descriptions were noted and sera and renal tissue samples were obtained from a large number of rodents, and sera and urine samples were obtained from dogs captured in each of these study sites. Any symptoms of disease were recorded for the dogs captured during this study. Seroprevalence for *L. interrogans* (s.l.) in these animals was determined by their relative antibody titers against 24 different pathogenic *Leptospira* serovars using the micro-agglutination test (MAT). Infections of these animals with *L. interrogans* (s.l.) was determined using the polymerase chain reaction (PCR) to amplify the *lipL32* gene and isolation of *L. interrogans* (s.l.) was attempted by culture in EMJH, EMJH-5'FU and Fletcher media.

Results: three neighborhoods in Barranquilla, Las Américas, Por Fin and Rebolo were identified as sites where there was a high risk of transmission of pathogenic *Leptospira* from animals to humans. From these neighborhoods, sixty-nine rodents, of *Mus musculus* (49/69), *Rattus rattus* (16/69) and *Rattus*

norvegicus (4/69), and 83 *Canis familiaris* (dogs) were captured from november 2008 to september 2009. The seroprevalence for *L. interrogans* (s.l.), determined using the MAT, was 20,4% (IC 95% 9,1-31,6%) for serovars Grippothyphosa, Canicola, Icterohaemorrhagiae and Georgia (serogroup Mini) in the *M. musculus*; 12,5% (IC 95% 0-28,7%) for serovars Grippothyphosa and Jin (serogroup Serjoe) in the *R. rattus* and 25,0% (IC 95% 0-67%) for serovar Bratislava (Australis serogroup) in the *R. norvegicus*. The seroprevalence for *L. Interrogans* (s.l.) in *C. familiaris* was 22, 9% (IC 95% 13,9-31,9%), with the most prevalent serovars, being Icterohaemorrhagiae, Lousiana and Vughia (Tarassovi serogroup), followed by Hurstbridge (Fanei serogroup), Bankinang (Autumnalis serogroup), Canicola and Grippytyphosa. The highest numbers of pathogenic serovars were found in rodents and dogs captured in Rebolo, adjacent to the international sea-port. There was also no statistically significant association between and clinical symptoms observed in these captured dogs and the presence or absence of pathogenic *Leptospira* specific antibodies. The *lipL32* gene of pathogenic *L. interrogans* (s.l.) was detected by PCR in 12, 5% (IC 95% 0-28,7%) of the *R. rattus* and 3.7% (IC 95% 0-8,73%) of the *C. familiaris* captured and *L. interrogans* (s.l.) was isolated by culture from one of these *R. rattus* (IC 95% 0-18,2%). Other domestic (horses and pigs) and wild (opossums) animals were also observed in close proximity to human dwellings in the three neighborhoods.

Conclusions: at least six and seven pathogenic *L. interrogans* serovars were identified as circulating in the rodent and dog populations captured in these study sites in Barranquilla using serology (MAT), respectively. Interestingly, *L. interrogans* (s.l.) of the Icterohaemorrhagiae and Vughia serovars, which were both identified as highly prevalent in dogs, were detected in human cases of leptospirosis in these study neighborhoods. The other domestic (horses and pigs) and wild (opossums) animals observed in close proximity to human dwellings in the three neighborhoods may also potentially act as reservoirs for the transmission of pathogenic *Leptospira* to humans. A vaccine that contains *L. interrogans* serovars Vughia, Lousiana and Hurstbridge, if available, as well as Icterohaemorrhagiae, should be administered to dogs in these neighborhoods to reduce the likelihood of transmission of these pathogenic serogroups to humans.

Key words: leptospirosis, dogs, rodents, urban areas, Microagglutination, PCR.

1.0 INTRODUCCION

La leptospirosis es una zoonosis que se presenta en todo el mundo, en el sentido estricto de la palabra, es una antropozoonosis (Levett & Edwards, 2009). El agente causal es una espiroqueta patógena perteneciente a la familia Leptospiraceae y al género *Leptospira*. Actualmente se conocen 20 especies, de las cuales 13 contienen cepas patógenas y patógenas intermedias. Sin embargo, por fines prácticos se usa la clasificación basada en la relación antigénica, en donde se describen 24 serogrupos que contienen más de 250 serovariedades (Galloway and Levett, 2010).

En la leptospirosis, el reservorio porta las espiroquetas en sus túbulos renales (Levett & Edwards, 2009) y la infección se produce donde quiera que haya un riesgo de contacto directo o indirecto con la orina o los riñones, producto de animales infectados, también con aguas superficiales, barro y suelo contaminado con la orina infectada (Perolat *et al*, 1999). Sin embargo, los microorganismos mueren en condiciones ácidas ($\text{pH} < 7,0$) o sequedad, por lo que la trasmisión se limita a ambientes de humedad (Faine, 1999).

La población humana tanto rural como urbana, se encuentra en riesgo de infección debido al tipo de actividad laboral, (trabajadores de las alcantarillas, matarifes, carniceros, veterinarios), recreacional (campamentos, agricultura

aficionada) o por practicar deportes en el agua (canotaje, descenso de ríos y natación), que permite el contacto cercano con huéspedes de mantenimiento y accidentales o con los suelos y aguas contaminadas con orinas infectadas (Perolat, 1999).

En áreas tropicales, el clima cálido y húmedo, las condiciones socio-económicas reflejadas en una vivienda no saludable y las altas precipitaciones, como consecuencia del impacto del cambio climático, favorecen la aparición de epidemias y epizootias con grandes repercusiones en vidas humanas, animales y por consiguiente, económicas (Levett, 2001).

La importancia de los roedores está dada por su papel como reservorios de las especies patógenas de *Leptospira*, especialmente las ratas, las cuales se encuentran asociadas a las formas graves de leptospirosis humana (Bonilla-Santiago, *et al.*, 2011); es así que éstos animales se constituyen en fuente permanente de infección para humanos y otros animales en zonas rurales y urbanas.

En las áreas urbanas los principales roedores reservorios de *L. interrogans* son la rata de alcantarilla (*Rattus norvegicus*), la rata negra o de techo, (*Rattus rattus*) y los ratones (*Mus musculus*) (Marder, 2008). Así mismo, la presencia de perros ha sido identificada como un indicador de riesgo para adquirir la enfermedad en humanos (Douglin *et al.*, 1997).

En Barranquilla, no se han desarrollado estudios que suministren datos de seroprevalencia y describan serovares de *L. interrogans* (s.l.) en roedores y perros de la ciudad. Los datos en humanos, desde el año 2008, se basan en pruebas rápidas las cuales no identifican serovares infectantes, siendo escasos los estudios de caracterización de este tipo (Pedro Arango, Secretaría de Salud Pública de Barranquilla, 2010).

Por esta razón para responder a la pregunta de investigación: ¿Cuál es el rol epidemiológico de los roedores y los perros en la transmisión de leptospiras patógenas en los barrios de Barranquilla donde se ha detectado alta incidencia de leptospirosis humana? Se realizó un estudio transversal en tres barrios ubicados en el suroriente (Rebolo), suroccidente (Por Fin) y localidad metropolitana (Las Américas) de Barranquilla; en estas áreas se describió el entorno, las viviendas y se hizo captura de roedores y perros.

Las muestras tomadas a los perros y los roedores capturados fueron transportados al Laboratorio de Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte, donde se realizaron cultivos, pruebas serológicas y se aplicó la Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar las infecciones de estos animales con *L.interrogans* (s.l.).

Los resultados de esta investigación muestran que varios serovares patógenos de *Leptospira* son mantenidos por roedores de las tres especies capturadas,

afectando animales domésticos entre los cuales se encuentran los perros, que son animales de compañía de la mayoría de los habitantes en los barrios Las Américas, Por Fin y Rebolo; convirtiéndose en un riesgo para la salud pública de la ciudad, lo cual está sustentado por los datos publicados en 2009 por Romero-Vivas (Biomédica 2009; 29 Supl : 200-201), donde se halló anticuerpos contra *Leptospira interrogans* (s.l.) en sueros pareados, colectados en humanos durante los años 2000, 2007, 2008 y 2009 en la ciudad de Barranquilla; siendo los serovares patógenos diagnosticados los que también se hallaron circulando entre la población animal del presente estudio.

2.0 JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica emergente que afecta a los humanos a nivel mundial (Levett, 2001), causada por las cepas patógenas del género *Leptospira*, las cuales se han adaptado a sobrevivir por largos periodos de tiempo en el agua o suelo después de haber sido excretadas en la orina o fluidos corporales de animales silvestres o domésticos infectados (Farr, 1995-Giraldo de León, *et al* 2002). Antes de 1989, dos especies de *Leptospira* fueron reconocidos: *L. interrogans sensu lato* (patógena) y *L. biflexa sensu lato* (no patógena). Desde entonces, 250 serovares (unidad sistemática) de *Leptospira* patógena y 60 de *Leptospira* no patógena han sido descritas, basados en pruebas serológicas (Faine, 1999). Más recientemente, 20 genomoespecies del género *Leptospira* han sido hasta ahora definidas usando análisis de secuencias de ADN y de las cuales 13 contienen cepas patógenas y patógenas intermedias (Galloway & Levett, 2010; Ko, 2009). Sin embargo, por razones prácticas y por características antigénicas, los serovares dentro del complejo de *L. interrogans sl*, han sido divididos en 24 serogrupos (Bharti *et al.*2003; WHO, 2003).

La *Leptospira* patógena es mantenida crónicamente en los túbulos renales de animales infectados, los cuales pueden servir de reservorios (huéspedes de mantenimiento), como es el caso de roedores y marsupiales (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001); mientras que otras especies de animales actúan como huéspedes accidentales, los cuáles desarrollan la enfermedad tales como perros (Prescott., 2002; Rodríguez *et al.*, 2004), cerdos (Giraldo de León *et al.*, 2002), caballos (Faber *et al.*, 2000), bovinos (Surujballi & Mallory, 2004) y humanos, entre otros. Algunos serovares se encuentran asociados a especies animales particulares, por ejemplo, el serovar Hardjo, Canicola e Icterohaemorrhagiae se mantienen en bovinos, perros y ratas respectivamente; sin embargo, un mismo serovar puede encontrarse en diferentes huéspedes y una especie animal puede ser hospedera para diferentes serovares (WHO, 2003). Algunas especies que son consideradas como huéspedes de mantenimiento, pueden también desarrollar la enfermedad después de infectarse con otro tipo de serovar (Levett, 2001).

La leptospirosis ha sido tradicionalmente considerada como una enfermedad rural (Vinetz, 2004). Tres ciclos epidemiológicos han sido descritos: transmisión en climas templados, en climas tropicales y en zonas urbanas (Faine, 1999). En áreas tropicales, actividades ocupacionales relacionadas con la agricultura, son consideradas como factor de riesgo, el cual es incrementado por el clima (altas temperaturas y elevada precipitación) y el número elevado de especies

animales las cuales pueden actuar como huéspedes de mantenimiento. Estos factores contribuyen a la gran diversidad de serovares de *Leptospira spp* circulando en animales silvestres, peridomésticos y domésticos de estas regiones, que pueden transmitir la bacteria de forma directa o indirecta a la población humana, particularmente durante las estaciones de lluvia (Sanders *et al*, 1996; Trevejo *et al.*, 1998; Bharti, 2003).

En la transmisión urbana, particularmente en barrios de condiciones socio-económicas bajas, ratas y perros son considerados como las fuentes de infección más importantes de *Leptospira spp* a humanos (Ko *et al.*, 1999; Montes *et al.*, 2002; Pezzella *et al.*, 2004; Seijo *et al.*, 2002; Thierman, 1980; Thierman & Frank, 1980; Vinetz *et al.*, 1996). En las áreas periurbanas, sin embargo, otros animales tales como marsupiales y quirópteros también han sido registrados como huéspedes de mantenimiento para la transmisión de la *Lepstospira* patógena a humanos (Bunnell *et al.*, 2000).

En Barranquilla (Fig.1) la leptospirosis humana es una enfermedad endémica que combina el ciclo urbano y el tropical, afectando a la población de todas las edades (Ver marco teórico numeral 4.0 y Tabla 4). Según la Secretaría Distrital de Salud, en un censo realizado a comienzos del año 2007 (para la preparación de este proyecto) y recientemente en el año 2009, todos los barrios del sur de la ciudad presentaron un 100% de infestación con roedores (información basada en las campañas de desratización, hallazgo de heces características

en las viviendas inspeccionadas). En estos barrios se identificaron “zonas de riesgo,” basados en datos sobre casos recientes de leptospirosis humana. Sin embargo, esta enfermedad se encuentra sub-diagnosticada debido a la poca información entre profesionales de la salud acerca de esta, además puede confundirse clínicamente con otras infecciones como dengue, endémico también en esta región del país.



Fig. 1 Ubicación estratégica de Barranquilla como puerto fluvial y marítimo (Tomado de Google Earth on line, 2010).

En Barranquilla, la época de lluvia abarca los meses de abril hasta noviembre

(Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe-CIOH, 2009) con precipitaciones que afectan el sistema vial de la ciudad, transformándolos en "canales" de drenaje por los cuales se evacuan las aguas lluvias (Fig.2). Adicionalmente, el depósito de basuras en los arroyos urbanos, para que sean arrastradas por la corriente, da lugar a taponamientos que incrementan el volumen de agua, ocasionando inundaciones en determinados sectores (Fig.3). Se ha observado también, que luego de descender el nivel de las aguas, estas se esparcen sobre las vías propiciando suciedad y deterioro ambiental.

Sumado a esta problemática, resulta importante destacar la categoría de distrito portuario marítimo, fluvial y aéreo que caracteriza a esta ciudad. Este puerto cubre dos rutas principales, la del río Magdalena que lo comunica con el interior del país y la del mar Caribe, lo que le permite realizar nexos con otros países (Sociedad Portuaria Regional de Barranquilla SA, 2009), constituyéndose en una puerta abierta para el ingreso y salida de agentes infecciosos; y de esta forma en un factor de riesgo para adquirir diversas enfermedades, entre estas, la leptospirosis (Fig.4).

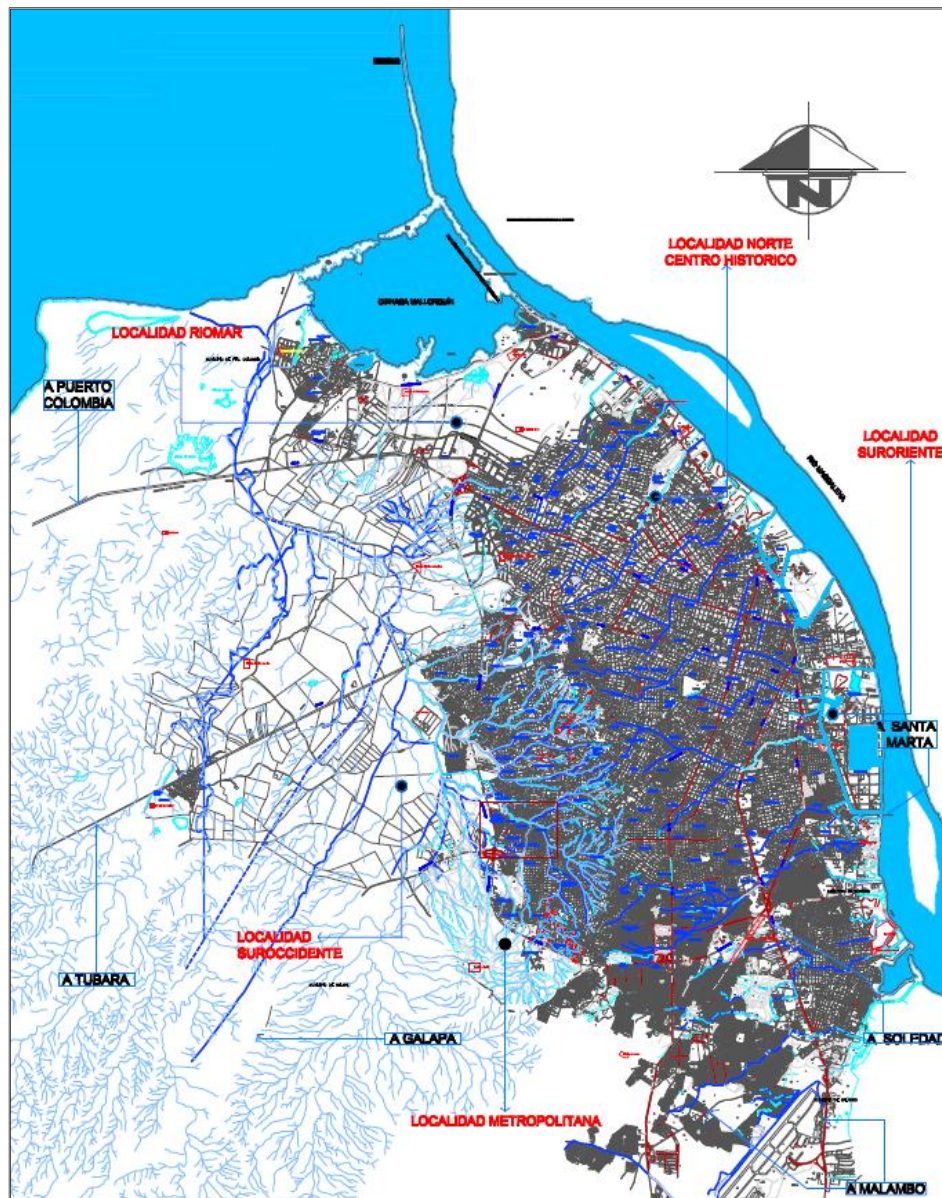


Fig. 2 Cuenca hidrográfica de Barranquilla: ilustrando el recorrido de los arroyos (línea azul) por los distintos barrios de la ciudad (organizados actualmente por localidades). Cortesía de la Alcaldía Distrital de Barranquilla. Departamento de Planeación



Fig.3. Barranquilla durante la época lluviosa. A) B) C) Nótese los arroyos que se alcanzan a formar rápidamente en las calles de la ciudad, dificultando el flujo peatonal y vehicular. Sin embargo algunas personas se arriesgan a atravesarlos, algunas veces sin tomar cuidado de sumergirse con los pies descalzos en las aguas que se mezclan con residuos de alcantarillas rebosadas (A y D). Fuente: Margaret Cuello P. Grupo de Investigaciones en Enfermedades Tropicales. Universidad del Norte.



Fig. 4. Panorámica del Puerto de Barranquilla. En A) la flecha señala una embarcación de carga en la riera del Rio Magdalena. En B) y C) se aprecia La Sociedad Portuaria Regional de Barranquilla (Terminal Marítimo y Fluvial Multipropósito que presta servicios entre los que se encuentra ser importadores y exportadores de diversos productos), localizada cerca a una de las áreas incluidas en este estudio. Imágenes tomadas de Google Earth on line, 2010.

Esta zona portuaria de la ciudad se encuentra próxima a sitios donde se comercializan productos alimenticios y a barrios donde se ha registrado casos humanos de leptospirosis.

Por todo lo anterior es necesario tener la información que permita determinar el papel epidemiológico que juegan los perros y los roedores en la circulación de serogrupos patógenos de *L. interrogans* en la ciudad de Barranquilla, para contar con datos que permita a las autoridades de salud, intervenir las comunidades y tomar medidas para disminuir la incidencia de la enfermedad en humanos y otros animales.

Por último, el aislamiento de cepas patógenas, una vez se complete su caracterización genética, permitirá disponer de cepas locales, tanto en Barranquilla, como en el resto del país, para ser usadas como parte del cepario de *L. interrogans* a nivel regional y nacional. Esto tiene mucha importancia ya que muchas veces no se logra detectar anticuerpos en el suero problema, debido a que la cepa causante no se encuentra incluida en el panel utilizado, y por consiguiente, no se puede excluir este agente etiológico como causante del cuadro clínico (WHO, 2003).

3.0 MARCO TEÓRICO

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, causada por espiroquetas patógenas que pertenecen a la especie *Leptospira interrogans s.l.* La infección es mantenida en la naturaleza por animales que portan la bacteria de forma crónica en los túbulos renales, excretando los microorganismos en la orina y contaminando de esta forma el medio ambiente (Levett ,2007). Entre los animales más importantes involucrados en la transmisión de la infección a humanos se encuentran los sinantrópicos como son los roedores y los domésticos como perros, vacas, cerdos, etc. (Faine *et al.*, 1999; Levett and Edwards, 2009).

L. interrogans fue demostrada en el año 1915 en Japón por Inada & Ido en sangre de mineros ictericos y en Alemania por Uhlenhuth-Fromme/Hubener-Reiter quienes observaron espiroquetas en conejillos de India después de haber sido inoculados con sangre de soldados enfermos provenientes de las trincheras francesas (Levett, 2001). Sin embargo, la forma severa de la enfermedad había sido descrita 29 años antes por Adolf Weil como un síndrome icterico con insuficiencia renal.

La primera demostración de la bacteria la hizo Stimson en 1907 por medio de la tinción de plata en los túbulos renales de un paciente que había fallecido con

un diagnóstico de fiebre amarilla; y este mismo investigador sugirió el nombre de *Spirochaeta interrogans* a los microorganismos observados (Faine, 1999).

El papel de las ratas como fuente de infección humana fue descubierta en 1917, al igual que el reconocimiento del potencial de enfermedad en perros, pero tardó varios años distinguir la infección canina con *L. interrogans* serovar Canicola de la infección con el serovar Icterohaemorrhagiae (Levett, 2001). Cabe resaltar la importancia del reconocimiento temprano de la ocupación en humanos como un factor de riesgo para adquirir la infección por esta bacteria (Levett, 2001).

Luego de la década de los años 90 el interés en leptospirosis se ha visto aumentado por convertirse en una enfermedad infecciosa re-emergente que afecta poblaciones humanas a escala global. El potencial de que ocurran epidemias en climas tropicales como templados, tanto en países industrializados así como en países en vía de desarrollo, ha recibido una importante atención por parte de los medios de comunicación (Vinetz, 2001).

En áreas rurales se ha registrado brotes que se han visto asociados a fuertes lluvias e inundaciones que ocurren de forma regular en estas áreas. Sin embargo, también en zonas urbanas los habitantes de tugurios han resultado afectados, al igual que los deportistas que practican actividades en lugares exóticos. Gran parte del interés internacional en leptospirosis deriva de los

casos que se han presentado en América Central y Suramérica después de las inundaciones como resultado de fuertes lluvias relacionadas con fenómenos climáticos (Levett, 2001).

3.1 Microbiología de *Leptospira*

Las leptospiras pertenecen al Filo Spirochaetes, Clase Spirochaetes, orden Spirochaetales, Familia Leptospiraceae, que incluye los géneros *Leptospira*, *Leptonema* y *Turneriella* (Noguchi, 1917). Inicialmente se reconocieron dos especies de *Leptospira*: *Leptospira interrogans sensu lato*, que agrupa todas las leptospiras patógenas y *Leptospira biflexa sensu lato* que agrupa las leptospiras sin capacidad patogénica, que son saprófitas o de vida libre (Faine, 1999).

Las leptospiras tienen un tamaño aproximado entre 0.1µm de diámetro- 6–25 µm de longitud, pero ocasionalmente hay cultivos que pueden contener células más largas. (Levett and Edwards, 2009).

Su visualización se realiza con ayuda del microscopio de campo oscuro y su estructura se aprecia mejor con el microscopio electrónico donde se observa la célula cilíndrica (protoplasma cilíndrico) y las hendiduras de la hélice alrededor del axostilo; la amplitud helicoidal es de aproximadamente 0,1 µm -0,15 µm. Las células tienen los extremos puntiagudos y constan de dos filamentos axiales (flagelo periplásmico) insertos en la porción subterminal de los extremos

de la célula (Fig.5), que se encuentran también en el espacio periplásmico (Levett and Edwards).

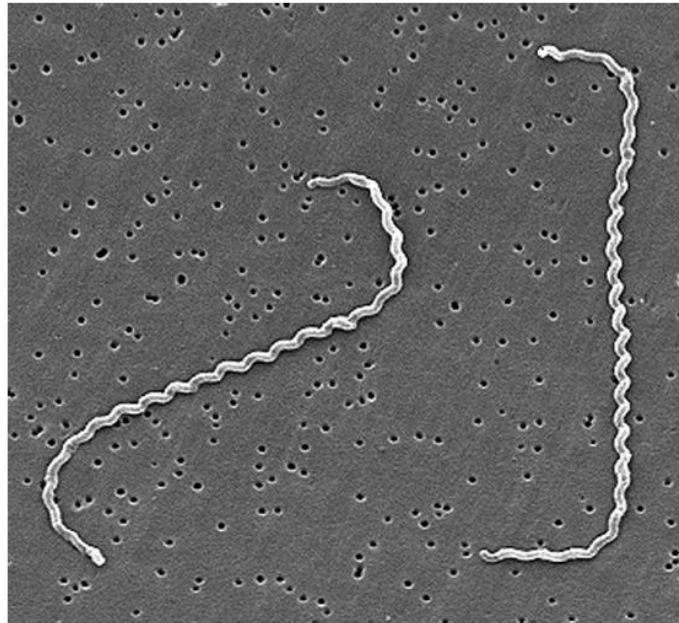


Fig. 5. *Leptospira interrogans* observada bajo microscopia electrónica de barrido. Tomado de Levett and Edwards. Leptospirosis. Capítulo 21 Bacterial Infections of Human. 4º Edición. 2009

Los antígenos que reaccionan con inmunoglobulinas producidas en animales tras la infección o inmunización, pueden ser identificados en la superficie flagelar (Faine, 1999).

Una envoltura externa cubre el protoplasma cilíndrico y el axostilo, el cual se encuentra delimitado por la membrana citoplasmática. Se cree que el filamento axial es parte del citoesqueleto y sirve para conferir el movimiento del microorganismo, este se adhiere a la superficie interna de la membrana y se contrae periódicamente, provocando la rotación del espiral y el consecuente

movimiento bacteriano (Barthi, 2003), el cual puede presentarse en dos formas distintas, ya sea de rotación o traslación. Al observar una preparación húmeda con microscopio de campo oscuro se ven las leptospiras girando rápidamente alrededor de su eje y trasladándose en cualquier dirección (Levett and Edwards, 2009). Uno o ambos extremos suelen tener forma de gancho, impartiendo una forma serpentiforme a la bacteria cuando gira rápidamente. En los medios de cultivo semisólidos el movimiento suele ser más lento (Levett and Edwards, 2009).

Morfológicamente todas las leptospiras son indistinguibles. Las pruebas fenotípicas no son útiles para su identificación, por lo cual se debe utilizar una combinación de métodos moleculares y serológicos (Levett and Edwards, 2009).

El genoma posee un tamaño aproximado de 4.800 Kb aproximadamente, distribuido en dos cromosomas circulares, uno de 3.500-4,300 Kb y otro menor de 300-350 Kb de longitud respectivamente (Levett and Edwards, 2009). Este tamaño de genoma indica la capacidad de *Leptospira spp* para vivir en ambientes diversos como los que le proporcionan los reservorios animales y el medio ambiente donde vive libremente (Levett, 2001).

Las leptospiras crecen en medios de cultivo simples enriquecidos con vitaminas (B2 y B12 que son factores de crecimiento), ácidos grasos de cadena larga

utilizados como única fuente de carbono y metabolizados por β oxidación (Levett and Edwards, 2009). Son espiroquetas altamente móviles, aerobias estrictas, que crecen a 13°C (*leptospiras* saprófitas) y 28-30°C (*leptospiras* patógenas); el pH de óptimo desarrollo es 7,2 a 7,8, producen catalasa, oxidasa y presentan las características de bacterias Gram-negativas entre las que se encuentra, la composición del lipopolisacarido (Fig. 6).

Las leptospiras son fácilmente destruidas por la desecación, el calor moderado (42°-45°C durante pocos minutos), condiciones de acidez (pH menor de 7,0), alcalinidad (por encima de 7,8 aproximadamente), acción de desinfectantes cuaternarios, fenoles, halógenos, derivados del amonio y aldehídos (formaldehído, glutaraldehído).

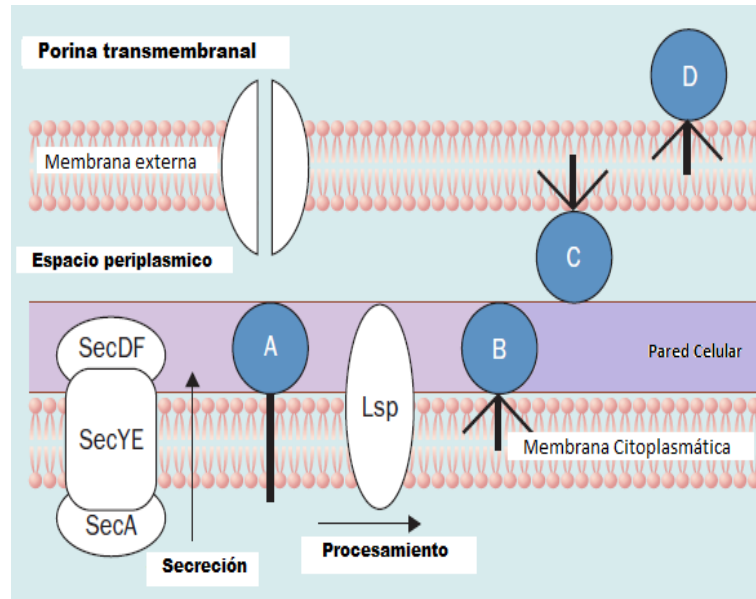


Fig. 6. Representación de la estructura de membrana en *Leptospira*. A) Pro lipoproteína. B) Lipoproteína de subsuperficie de membrana celular interna. C) Lipoproteína de subsuperficie ubicada en la cara interna de la membrana externa. D) Lipoproteína expuesta de superficie (posible determinante antigénico), se ubica en la cara externa de la membrana celular externa. Esquema modificado y adaptado al español de Bharti et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance Lancet Infect Dis 3. 2003. p 758.

3.2 Taxonomía de *Leptospira*

3.2.1 Clasificación fenotípica:

Antes de 1989, el género *Leptospira* se dividió en dos especies, *Leptospira interrogans* que comprende todas las cepas patógenas (*Leptospira interrogans sensu lato*) y *Leptospira biflexa*, que contiene las cepas saprofitas aisladas del medio ambiente (*Leptospira biflexa sensu lato*). *L. biflexa* se diferencia de *L. interrogans* porque en la primera el crecimiento es a 13 ° C, en presencia de 8-azaguanina (225 µg /ml) y por formar células esféricas en presencia de NaCl 1M (OMS, 2008).

L. interrogans y *L.biflexa* agrupan numerosos serovares, definiéndose un serovar como la unidad sistemática básica, sobre la base de similitudes y diferencias antigénicas. Cada serovar tiene una conformación antigénica característica (OMS, 2008), determinada mediante aglutinación por absorción cruzada con antígenos homólogos.

Dentro de la especie de *L. biflexa* s.l se han identificado 60 serovares, mientras que en *L. interrogans* s.l. se han reconocido más de 250, los cuales han sido agrupados, de acuerdo a sus similitudes antigénicas en 24 serogrupos (Tabla1). La Identificación de las cepas a nivel de serovar es un paso esencial para comprender la epidemiología de la enfermedad en seres humanos y animales en cualquier región geográfica. Por tanto, esta identificación sigue siendo una herramienta esencial para investigar detalles epidemiológicos en cualquier región (Levett, 2007).

El género *Leptospira* se divide en 20 especies (Tabla 2), de las cuales 13 contienen cepas patógenas y patógenas intermedias, incluyendo especies más recientes, tales como: *Leptospira licerasiae*, serovar *Varillal* aislada de un humano y especies de *Rattus* en Iquitos (Perú) y *Leptospira wolffii* aislada de la orina de un humano en Tailandia (Matthias et al., 2008; Slack et al., 2008, Slack et al., 2009; Galloway & Levett, 2010).

Tabla 1. Serovares de *Leptospira* patógena

Serogrupo	Serovar
Autumnalis	Autumnalis
Australis	Australis
Bataviae	Bataviae
Ballum	Arborea
Canicola	Broomi
Celledoni	Celledoni
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Grippotyphosa	Grippotyphosa
Hebdomadis	Hebdomadis
Hurstbridge	Hurstbridge
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
Javanica	Javanica
Lyme	Lyme
Louisiana	Louisiana
Manhao	Lushui
Mini	Mini
Panama	Panama
Pyrogenes	Pyrogenes
Pomona	Mozdok
Sarmin	Sarmin
Sejroe	Hardjo (Hardjoprajitno)
Sichuan	Leptospira genomospecies 1
Tarassovi	Nave

Adaptado de Levett & Edwards, 2009

Esta clasificación está basada en la homología del ADN, mediante el uso de la hibridación cuantitativa para medir las homólogas entre los ADN comparados. Si esta relación tiene al menos un 70% de homología y dentro de esta homología se encuentra hasta un máximo de 5% de bases despareadas, son consideradas como pertenecientes a una genomo-especie (Bharti, 2003). La

secuencia del gen *rrs*, que codifica para el rRNA 16S es la de mayor uso para estudios filogenéticos (WHO, 2008).

Si bien una clasificación genotípica es sólida, esta puede agrupar serovares patógenos y no patógenos dentro de una misma genomoespecie, conllevando a una confusión para los clínicos y epidemiólogos quienes han usado la clasificación fenotípica para sus descripciones y estudios (Bharti,2003). Por esta razón, este trabajo realizará la descripción fenotípica de *Leptospira* patógena por serogrupos, circulando en una población de roedores y caninos en Barranquilla.

Tabla 2. Clasificación genotípica de las especies de *Leptospira*

Especies	Serovar	Serogrupo	Serovar	Serogrupo
Patógenas				
<i>L. alexanderi</i>	Lushui	Manhao	Nanding	Hebdomadis
<i>L. alstoni</i> *	Grippotyphosa			
<i>L. borgpetersenii</i>	Arborea	Ballum	jules	Hebdomadis
	Balcanica	Sejroe	Mini	Mini
	Ballum	Ballum	Sejroe	Sejroe
	Hardjo (Hardjobovis)	Sejroe	Tarassovi	Tarassovi
	Javanica	Javanica		
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
	Autumnalis	Autumnalis	Kennewicki	Pomona
	Bangkok	Australis	Kremastos	Pomona
	Bataviae	Bataviae	Lora	Australis
	Bratislava	Australis	Medanensis	Sejroe
	Broomi	Canicola	Mwogolo	Ictero
	Bulgarica	Autumnalis	Naam	Ictero
	Canicola	Canicola	Paidjan	Bataviae
	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	Pomona	Pomona
	Djasiman	Djasiman	Pyrogenes	Pyrogenes
	Hardjo (Hardjoprajitn)	Sejroe	Szwajizak	Mini
	Hebdomadis	Hebdomadis	Zanoni	Pyrogenes
<i>L. kirschneri</i>	Bim	Autumnalis	Mwogolo	Icterohaemorrhagiae
	Bulgarica	Autumnalis	Mozdok	Pomona
	Cynopteri	Cynopteri	Kunming	Pomona
	Grippotyphosa	Grippotyphosa		
<i>L. noguchii</i>	Bajan	Australis	Louisiana	Louisiana
	Fortbragg	Autumnalis	Panama	Panama
<i>L. santarosai</i>	Bataviae	Bataviae	Pyrogenes	Pyrogenes
	Borincana	Hebdomadis	Tabaquite	Mini
	Kremastos	Hebdomadis	Tinidad	Sejroe
	Navet	Tarassovi	Weaveri	Sarmin
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Mengma	Javanica
	Hainan	Celledoni	Sarmin	Sarmin
Intermedias				
<i>L. broomii</i>	Undesignated	Undesignated		
<i>L. faineii</i>	Hurstbridge	Hurstbridge		
<i>L. licerasiae</i> †	Varillal			
<i>L. inadai</i>	Lyme	Lyme		
<i>L. wolffii</i> †††				
No patógenas				
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Semarang		
<i>L. kmetyi</i> ††	Malaysia			
<i>L. meyeri</i>	Ranarum	Sejroe		
<i>L. terpstae</i> *				
<i>L. vanthielii</i> *				
<i>L. wolbachii</i>				
<i>L. yanagawae</i> *				

Cuadro Tomado y modificado de Levett & Edwards. *Leptospirosis* Evan's Bacterial Infections of Humans. 4º Ed 2009.* National Center for Biotechnology Information (Taxonomy Brouser), 2011; Ko A. *et al.*, 2009; Haake D *et al.*, 1993. † *Leptospira licerasiae* en Iquitos-Perú. Matthias *et al.*, 2008. †† *Leptospira kmetyi* en Johor, Malaysia. Slack *et al.*, 2009. ††† *Leptospira wolffii* en Tailandia. Slack *et al.*, 2008.

3.3 Descripción del modo de transmisión

Las leptospiras ingresan al organismo de forma directa o indirecta

3.3.1 Transmisión directa

La transmisión directa se produce cuando la sangre o fluidos corporales que contienen leptospiras pasan directamente de un animal con infección aguda, o por la orina de un portador renal a otro animal susceptible (Faine, 1999). En este caso los modos de transmisión incluyen: forma transplacentaria, congénita en cualquier etapa de la gestación, por contacto sexual en algunos animales, o por medio del amamantamiento (Faine, 1999). Esta forma de transmisión de los animales a los humanos también se produce, como una enfermedad profesional de los manipuladores de animales, sus productos o cuando se adquieren animales de compañía o también por vía oral (Faine, 1999; Silverman *et al.* 2004)

3.3.2 Transmisión indirecta

La transmisión indirecta se produce cuando se adquieren leptospiras del medio ambiente contaminado con la orina de animales portadores que las excretan a aguas superficiales (lagunas, lagos, ríos, arroyos), suelo y barro (Faine, 1999).

3.4 Descripción de la patogenicidad

Después del ingreso al organismo por abrasiones en la piel o por medio de las mucosas (Vivian JP, 2009), las leptospiras aparecen en la sangre e invaden todos los tejidos y son eliminadas por la respuesta inmune humoral del organismo; sin embargo algunas cepas de *L. interrogans* pueden asentarse en los túbulos contorneados de los riñones e irse eliminando periódicamente por la orina a lo largo de semanas o meses (WHO, 2003).

El efecto de las leptospiras patógenas se asocia con varios factores de virulencia, como esfingomielinasas, hemolisinas y porinas (Fontaine, 2006). Los mecanismos celulares y moleculares de la patogénesis de leptospira siguen siendo poco claros, (Murray *et al*, 2009). El análisis de la membrana externa en *L. interrogans* ha permitido identificar una serie de proteínas, siendo la más abundante LipL32, Lipoproteína de 32 KDa que es la principal proteína de membrana externa de las leptospiras patógenas y representa hasta un 75% del total de estas proteínas (Murray, 2009).

Esta proteína se expresa tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad y es altamente inmunogénica (Hoke *et al*, 2009). La abundancia, conservación, presencia única en especies patógenas y la inmunogenicidad de LipL32 juegan un papel importante en la patogénesis de *Leptospira* (Fig.7). Estudios al respecto han demostrado que LipL32 pueden actuar como una adhesina de

unión al colágeno, laminina y fibronectina (Hauk et al, 2008; Hoke et al, 2009) y también se ha asociado con hemólisis (Lee et al, 2000).

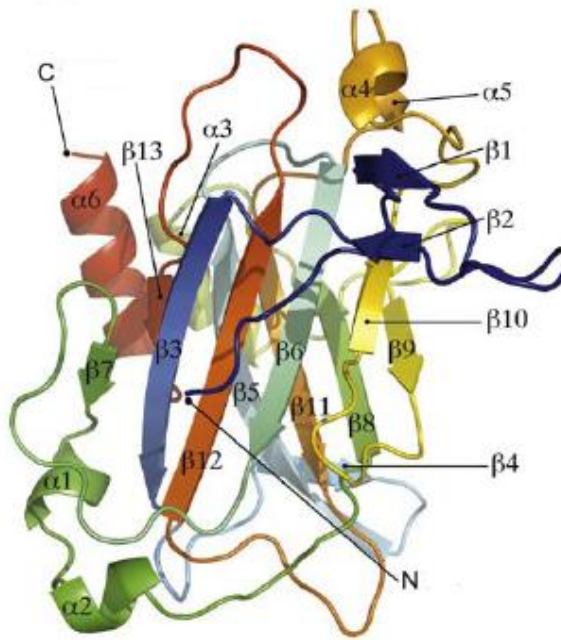


Fig. 7. Representación de la estructura de la proteína Lip 32. Tomado de Vivian P et al. Crystal Structure of LipL32, the Most Abundant Surface Protein of Pathogenic *Leptospira* spp. Journal Molecular Biology. Pag. 1231. 2009.

El tiempo necesario para desarrollar las lesiones depende del tamaño del inóculo (dosis infectante), el número de organismos virulentos, la tasa de crecimiento de los microorganismos en el huésped, su toxicidad y desarrollo de la inmunidad (Faine, 1999).

3.5. Breve descripción de la leptospirosis en humanos

La presentación clínica de la leptospirosis en humanos presenta un rango de signos y síntomas desde una forma leve, como una simple gripa, hasta un síndrome de Weil, caracterizado por ictericia, falla renal, hemorragia, choque y miocarditis con arritmias, meningitis/meningoencefalitis, hemorragia pulmonar con falla respiratoria y muerte.

La morbilidad de la leptospirosis no es conocida ya que esta enfermedad en humanos se confunde con otras enfermedades como el dengue, hepatitis, otras fiebres hemorrágicas y es de difícil diagnóstico o puede presentarse de forma leve (OMS, 2008).

La presentación clínica de la leptospirosis es bifásica, consta de una fase aguda o septicémica que dura alrededor de una semana, seguido de la fase inmune, caracterizada por la producción de anticuerpos y la excreción de leptospiras en la orina. La mayoría de las complicaciones de la leptospirosis se asocian con la localización de leptospiras en los tejidos durante la fase inmune, y por lo tanto se producen durante la segunda semana de la enfermedad (Levett, 2007). En las primeras etapas de la enfermedad, los síntomas incluyen fiebre alta, dolor de cabeza intenso, dolor muscular, escalofríos, enrojecimiento de los ojos, dolor abdominal, ictericia, hemorragias en la piel y las membranas mucosas, vómitos, diarrea y erupción cutánea (WHO, 2010).

3.6 Leptospirosis en animales

La *Leptospira* se ha encontrado infectando un amplio rango de huéspedes animales, especialmente mamíferos y algunos vertebrados de sangre fría (Bunell, 2000). Los reservorios de las leptospira pueden ser animales de granja, roedores peridomésticos, animales de compañía (perros) y animales salvajes como murciélagos y marsupiales.

Estas especies portan las leptospiras patógenas en los riñones, causándoles poco o ningún daño; si otras especies de vertebrados entran en contacto con estas leptospiras patógenas, se enferman, o incluso mueren actuando como huéspedes accidentales o incidentales (OMS, 2008).

Los huéspedes de mantenimiento más importantes son los pequeños mamíferos, a partir de los cuales se infectan los perros, otros animales y los humanos. La magnitud de la infección depende de varios factores como son el clima, la densidad de población y el grado de contacto entre el huésped de mantenimiento y los huéspedes accidentales. Las ratas son normalmente reservorios de los serovares *Icterohaemorrhagiae* y *Copenhageni*, mientras que los ratones mantienen el serovar *Ballum*. En la Tabla 3 se describen los huéspedes de mantenimiento más comunes y los serovares de *Leptospira* patógena que normalmente hospedan (Barthi, 2003).

Tabla 3. Reservorios típicos de serovares patógenas de *Leptospira*.

Reservorio	Serovar
Caballos	Bratislava
Cerdos	Pomona, Tarassovi, Bratislava, Australis
Mapaches	Grippotypcosa
Marsupiales	Grippotypcosa
Murcielagos	Cynopteri, Wolffi
Perros	Canicola
Ovejas	Hardjo
Ratas	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Ratones	Ballum, Arborea, Bim
Vacas	Hardjo, Pomona

Modificado de Barthi et al, 2003.

En los animales con leptospirosis se da una enfermedad sistémica, presentándose en ellos un rango variado de manifestaciones clínicas. La mayoría de los casos cursan de forma inaparente, especialmente en aquellos en los que los serovares están adaptados al huésped; sin embargo, otros serovares pueden participar en enfermedades más graves.

En perros se han identificado cuatro síndromes: ictericia, hemorragia, uremia, (enfermedad de Stuttgart) y problemas reproductivos (abortos y crías prematuras o débiles).

La leptospirosis típica en perros puede presentarse con fiebre, ictericia, vómito, diarrea, coagulación intravascular diseminada, uremia causada por falla renal, hemorragia y muerte (Bolin, 1996).

En vacas y cerdos los signos de leptospirosis incluyen falla reproductiva, abortos, mortinatos, momificación, lechones o terneros débiles según el caso y agalactia. Una manifestación crónica de leptospirosis es comúnmente observada en caballos como una uveítis recurrente (Rohrbach et al., 2005), pero no es exclusiva de esta especie y puede verse ocasionalmente en los humanos.

Los animales que logran recuperarse de leptospirosis pueden convertirse en portadores asintomáticos que mantienen leptospiras virulentas en los túbulos renales por largos periodos, excretando de esta forma leptospiras patógenas al medio ambiente (Levett, 2001).

Si bien la leptospirosis se ha considerado una enfermedad rural en donde el ganado vacuno y porcino son portadores crónicos y fuente alta de transmisión para humanos (Cachay & Vinets 2005), durante las últimas décadas se ha detectado a los roedores como la fuente zoonótica de la infección en áreas urbanas tales como en el Salvador, Brasil (Ko. *et al* 1999) o Baltimore (Vinetz, 1996), Detroit (Thierman, 1980) y Colombia (Agudelo-Flórez, 2009). En Estados Unidos los perros son considerados importantes fuentes de infección en la transmisión urbana, especialmente los callejeros y aún aquellos que han sido vacunados. Además, se ha notado el incremento en el número de perros infectados con serovares que no están incluidas en las vacunas comerciales.

En áreas tropicales, poca higiene, suelo húmedo, alta temperatura ambiental, estaciones de lluvia, y fenómenos naturales con altas precipitaciones, contribuyen a la aparición de brotes/epidemias (Fig. 8).

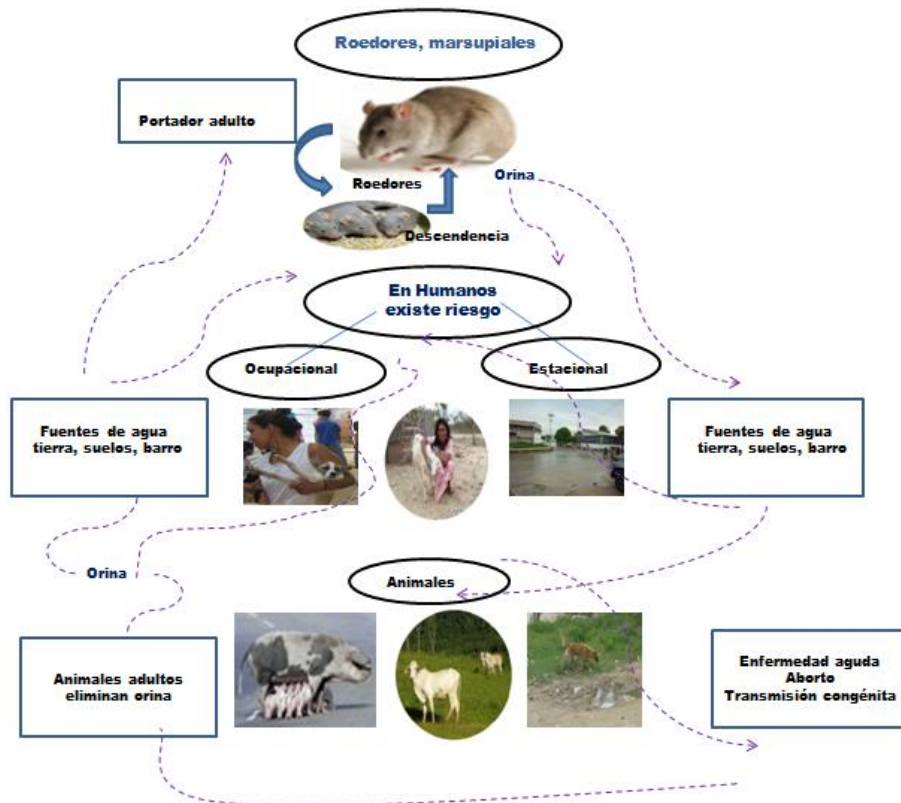


Fig. 8. Modo de transmisión de *Leptospira*. Naturaleza zoonótica de la enfermedad para el humano. Tomado y modificado de Faine et al *Leptospira*, p: 131. 1999

3.6.1 Leptospirosis aguda en perros

En su forma más evidente se manifiesta por apatía, pérdida de apetito, irritabilidad, fiebre, pliegues en la piel, ojos rojos, y algunas veces diarrea, que

ocurre después de 3-7 días de iniciada la infección. Puede haber signos de hemorragias e ictericia.

El movimiento se acompaña por una característica de arqueamiento de la espalda. En este estadio de la enfermedad el animal puede recuperarse o morir. Si logra la recuperación esta, se acompaña de pérdida de peso e insuficiencia renal (Faine, 1999).

La infección congénita del feto en el útero sigue un curso similar, lo que conlleva al aborto si el feto muere. Se caracteriza por ictericia, hemorragia o ambas, y el producto del aborto puede estar muy cargado con las leptospiras, lo que genera un peligro eminente para la sanidad ambiental y riesgo ocupacional.

En perros los signos clínicos se observan después de un período de incubación variable y comienzan con fiebre, vómitos, depresión, anorexia y los ojos rojos.

La infección por el serovar Canicola se desarrolla en forma aguda o subaguda. La forma subaguda más común se caracteriza por signos de nefritis que incluyen espalda arqueada, movimiento refractario, presencia de sangre en la orina, vómitos, sensación de riñones inflamados y depresión del animal. Estas características clínicas pueden ir acompañadas de fiebre, heces con sangre (melenas), y postración lo cual conlleva a la muerte si no hay intervención médica.

La clásica forma aguda de la infección por serovar Canicola se conoce como la enfermedad de Stuttgart (Faine, 1999).

Si los vómitos aumentan se produce deshidratación rápida acompañada de un colapso vascular; un signo de uremia profunda está determinado por presencia de melenas y por el desprendimiento de las superficies mucosas. Los perros mueren con frecuencia en 36 horas a 4 días después de la aparición de signos clínicos (Faine, 1999).

La forma subaguda de la infección por el serovar Icterohaemorrhagiae es similar en la naturaleza y el progreso de la infección con el serovar Canicola. La temperatura desciende, aparecen hemorragias visibles alrededor de la boca, los labios y la conjuntiva, así como hemorragia interna invisible. La muerte puede seguir horas o días después del inicio del cuadro, aunque algunos animales pueden permanecer durante 7-10 días. Puede presentarse ictericia, seguida de la muerte después de unos días (Faine, 1999).

3.6.2 Leptospirosis crónica en perros

Los animales que se han recuperado de leptospirosis aguda tienden a desarrollar una condición de portador en el que las leptospiras crecen y permanecen en los túbulos renales, por períodos que van de días a años. Los perros pueden sobrevivir a la infección con serovar Canicola o Icterohaemorrhagiae, y los que lo hacen, a menudo desarrollan cicatrices

renales profundas y varios niveles de insuficiencia renal crónica para el resto de sus vidas. Los perros con leptospirosis crónica desarrollan típicamente "riñones en estado final " presentando cicatrices e insuficiencia renal letal lo que conlleva a tener riñones no funcionales. Algunos de estos perros enfermos finalmente pueden sucumbir ante la enfermedad crónica (Faine, 1999).

3.7 Pruebas de laboratorio empleadas en el diagnóstico de leptospirosis

El diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis se puede realizar por demostración directa del microorganismo mediante microscopía de campo oscuro, coloración inmunohistoquímica y métodos moleculares o por pruebas serológicas que detectan anticuerpos anti *Leptospira*.

3.7.1 Diagnóstico con métodos directos

3.7.1.1 Microscopia de Campo Oscuro: útil para la demostración de las leptospiras en los fluidos, las cuales aparecen móviles, brillantes, con uno o ambos extremos curvos, contra un fondo negro; pero en repetidas ocasiones se ha mostrado de dudoso valor, porque tiende a confundirse las espiroquetas con proteínas séricas, hebras de fibrina y otros residuos. Además, la concentración de organismos en la orina de humanos y animales es

frecuentemente muy baja como para ser detectables por este método. El examen directo de especímenes clínicos por este método es poco sensible e inespecífico (Levett and Edwards, 2009; OMS, 2008).

3.7.1.2 Aislamiento bacteriano

La prueba diagnóstica definitiva es la recuperación de las leptospiras partir de muestras clínicas, ya sea por medio del cultivo, que tiene índices variables de sensibilidad y se torna lento. El aislamiento se realiza a partir de la sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR) durante los primeros 7-10 días de la enfermedad y de la orina durante la 2^a y 3^a semana de la misma. La sangre y muestras de LCR pueden ser recogidos con ayuda de anticoagulantes como heparina u oxalato de sodio y se transportan a temperatura ambiente (OMS, 2008).

El uso del anticoagulante citrato debe evitarse ya que es inhibitorio para estas espiroquetas, tampoco se recomienda congelar las muestras. Cuando se han obtenido las muestras, el cultivo se realiza en medios que contienen suero o albúmina. Varios medios líquidos que contienen suero de conejo han sido descritos por Fletcher, Korthoff, Noguchi, y Stuart. El medio de cultivo más utilizado en la práctica actual es el medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), el cual contiene Tween 80 y albúmina de suero bovino. Algunas cepas son más exigentes y requieren la adición de piruvato o suero de conejo

para el aislamiento inicial. El crecimiento de contaminantes en las muestras clínicas iniciales puede ser inhibido por la adición de 5-fluorouracilo (Levett, 2001). Incluso en condiciones óptimas, los organismos crecen lentamente y los cultivos pueden ser reportados como negativos sólo después de un mínimo de 6-8 semanas, preferiblemente 6 meses (Barthi, 2003). También las leptospiras aisladas pueden ser tipificadas para identificar los serovares, lo cual es útil para la vigilancia de los serovares patógenos locales, el reconocimiento de nuevos patrones de presentación de la enfermedad y la evaluación de la efectividad de las medidas de prevención.

3.7.1.3 Métodos de Tinción

Las leptospiras pueden ser coloreadas por una variedad de métodos de coloración entre los que se encuentran la coloración de plata que puede dar resultados satisfactorios; se han usado métodos de coloración inmunológica, tales como la inmunofluorescencia directa y variantes como la coloración de inmunoperoxidasa. Estos métodos pueden ser útiles en diagnósticos postmortem y en tejidos fijados o no. Sin embargo, todos ellos sufren los mismos errores de la microscopia de campo oscuro como son los altos riesgos

de falsos positivos y falsos negativos. Artefactos son fácilmente confundidos con leptospiras, particularmente cuando pocas están presentes (OMS, 2008).

3.7.1.4 Reacción en cadena de la Polimerasa

Este ensayo de biología molecular consiste en un método de amplificación de segmentos específicos del ADN de *Leptospira*, en muestras clínicas hasta alcanzar niveles detectables. De esta manera, la presencia de leptospiras es confirmada por la detección e identificación de segmentos específicos de su ADN.

La PCR puede confirmar rápidamente el diagnóstico en la fase temprana de la enfermedad, cuando la bacteria puede estar presente y antes que los títulos de los anticuerpos alcancen niveles detectables (OMS, 2008).

Entre varias técnicas de PCR, Paul Levett ha publicado una cuyo blanco en tiempo real es el gen de la principal lipoproteína de membrana externa, LipL32, importante en la virulencia de *Leptospira* y limitado solo a las cepas patógenas. Los iniciadores desarrollados en este ensayo también pueden ser utilizados para realización de ensayos de PCR convencional (Levett, 2005).

3.7.2 Diagnóstico con métodos indirectos

La serología es el método diagnóstico más usado para detectar leptospirosis.

3.7.2.1 ELISA

La ELISA usualmente solo detecta anticuerpos reactivos con un antígeno género específico ampliamente reactivo y por tanto, no da indicación del serovar o serogrupo causante de la enfermedad; solamente detecta anticuerpos, principalmente de tipo IgM indicando una leptospirosis actual o reciente. Cuando no se detectan anticuerpos o se encuentra un título bajo, una segunda muestra de suero debe ser examinada para observar seroconversión o un aumento en el título (OMS, 2008).

3.7.2. 2 Microaglutinación Microscópica (MAT)

La Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) permanece como prueba de referencia y es usada para detectar anticuerpos y determinar su título.

Se basa en la antigua prueba de lisis aglutinación desarrollada por Martín & Petit (1918) y modificada posteriormente. La MAT detecta tanto los anticuerpos tipo IgM como IgG, no puede ser estandarizada ya que utiliza antígenos vivos y factores como la edad y densidad del antígeno en el cultivo y la subjetividad del observador, puede influir en el título de aglutinación (Borg-Petersen & Fargroeus, 1949; Carbrey, 1960). La aglutinación se observa usando un

microscopio de campo oscuro. De acuerdo con el Subcomité de Taxonomía en *Leptospira*, el punto de corte se define como la dilución del suero que muestre el 50% de aglutinación cuando se compara con un control que consiste de un cultivo diluido 1:2 en tampón fosfato salino (Comité Internacional sobre Bacteriología Sistemática, 1984).

Los pacientes producen, normalmente, anticuerpos aglutinantes contra el serovar infectante; sin embargo, anticuerpos con reacción cruzada frente a otros serovares también son a menudo encontrados, siendo esto particularmente notable al inicio de la infección. En las primeras semanas de la enfermedad, las reacciones cruzadas heterólogas con otros serovares pueden ser aún más fuertes que la reacción homóloga con el serovar infectante.

Ocasionalmente, una reacción heteróloga puede ser positiva mientras que una reacción homóloga es o permanece negativa, fenómeno llamado reacción paradójica. El título de los anticuerpos de reacción cruzada tiende a disminuir relativamente rápido, después de algunos meses, mientras que los anticuerpos serogrupo y serovar específicos pueden persistir por un tiempo más largo. (OMS/OPS, 2008).

Los resultados logran ofrecer una indicación del serogrupo al cual pertenece el serovar infectante, pero raramente identifica este último.

La interpretación de los datos serológicos siempre se basa en el examen de muestras colectadas secuencialmente, es decir, dos muestras obtenidas dentro

de un período de tiempo mínimo de varios días después de la aparición de los síntomas (10-14 días) (Levett and Edwards, 2009).

3.7.2.3 Inmunofluorescencia

Útil con muestras biológicas, además de la orina y tejidos que han sido congelados. También es útil en el examen de las muestras donde no hay indicación de la serovariedad infectante o si la muestra es de una región donde los serovares endémicos no han sido identificados.

Si el antisuero específico está disponible, un conjugado de inmunofluorescencia específica puede ser producido y utilizado para identificar presuntivamente el serovar de *Leptospira* en una muestra (Faine, 1999).

3.7.3 Diagnóstico diferencial

En el hombre y en animales la leptospirosis debe diferenciarse de otras enfermedades y las últimas deben diferenciarse de aquellas que afectan la reproducción (Brucelosis, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Diarrea Viral Bovina, Hepatitis o Nefritis (Martínez G, 2000).

En caninos, más exactamente durante la fase aguda de la enfermedad se deben considerar procesos como la nefrosis tóxica aguda por etilenglicol o metales pesados, hepatopatía, hepatitis infecciosa canina, ehrlichiosis, dirofilariosis, anemia hemolítica autoinmune, lupus, toxoplasmosis, neoplasias cálculos renales, meningitis y sepsis (Miranda Lenzy, 2008).

En la fase crónica se debe tener en cuenta todas las causas de aborto, así como el síndrome del cachorro débil, brucelosis canina, infección por herpes virus canino y distemper canino (Miranda Lenzy, 2008).

3.8 Tratamiento y control

Los antibióticos ampliamente utilizados son la penicilina, cefotaxime, ceftriazona y doxiciclina. Esta última se recomienda para la quimioprofilaxis (Levett and Edwards, 2009).

La penicilina se considera aún el método de elección dentro de los antimicrobianos para el tratamiento de leptospirosis moderada a grave, aunque un estudio clínico prospectivo identificó igual eficacia en la ceftriazona (Panaphut et al, 2003).

El tratamiento de casos agudos de leptospirosis canina es indispensable para evitar complicaciones a nivel renal y hepático y eliminar la leptospiuria. Los antibióticos utilizados son la penicilina G procaina (40.000 a 80.000 unidades por kg/ IM/1 vez al día, ó dosis divididas 2 veces al día), ampicilina o amoxicilina. La eliminación de leptospiras del tejido intersticial renal, a fin de controlar el estado portador se logra mejor utilizando dihidroestreptomicina (10 a 15 mg/kg/ IM dos veces al día durante 2 semanas) o estreptomicina (McDonough, 2001).

Como métodos de control se incluye las campañas de vacunación canina, sanidad de perreras en cuanto a eliminación de fuentes que contenga orina contaminada, conocimiento por parte de las comunidades del riesgo que en mayor proporción presentan los perros cazadores y perros callejeros, el uso cuidadoso de rodenticidas en los ambientes de estancia del animal etc. (McDonough, 2001).

3.9 Inmunización

Las vacunas para el control de la leptospirosis en perros se introdujo en el año de 1939, en los cerdos y ganado se logró poco después. Estas vacunas también contribuyen, indirectamente con la protección de los seres humanos por la reducción de la excreción de leptospiras por los animales (pero no su eliminación total (Levett and Edwards, 2009).

Preparaciones efectivas para la protección de humanos y animales se han realizado mediante la inactivación de leptospiras en cultivo por medio de calor o formalina y la inyección de dosis, vía subcutánea o intramuscular.

La principal limitación con el uso de vacunas en los perros y otros animales como (cerdos, bovinos) es la posibilidad de infección con serovares que no se encuentran incluidos en la vacuna, los cuales representan una fuente infección humana y además se ha observado que los bovinos, porcinos y caninos son

protegidos contra el desarrollo de la enfermedad, pero no contra la infección. (Levett and Edwards, 2009).

En Colombia se encuentra a disposición una vacuna compuesta por microorganismos inactivados de *L. interrogans* serovar Canicola y *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (Nobivac® L). El esquema de vacunación consiste en la inmunización doble en perros que no hayan sido vacunados previamente, con un intervalo de 2-4 semanas. Los cachorros deben tener al menos 8 semanas al momento de la primera vacunación. Luego de la vacunación básica, una sola dosis anual es suficiente para proteger a los animales durante un año contra la leptospirosis canina (Shering Plough, 2010).

4.0 Leptospirosis en Colombia

La leptospirosis humana fue diagnosticada por primera vez en el año 1969 (González et al., 2000) y la primera epidemia fue reportada en la ciudad de Barranquilla durante la estación de lluvia del año 1995 (Epstein et al., 1995), con una tasa de fatalidad del 23% (Pérez-García, 1997).

Prevalencias parciales en humanos, cerdos y perros usando MAT han sido publicadas, estos estudios fueron realizados usando solamente muestras únicas, en la mayoría de los estudios en humanos usando pocos serovares y con sueros en las fases agudas lo que hace que se presenten reacciones cruzadas entre diferentes serogrupos (Levett, 2001; Macias et al., 2005).

En Antioquia, el 22,4% de anticuerpos anti-*Leptospira* se presentó entre trabajadores de granjas porcícolas, usando seis serovares; fueron encontrados los serovares Pomona, Bratislava y Hardjo (Ochoa *et al.*, 2000). En la región del Urabá Antioqueño en un estudio epidemiológico que abarcó la zona urbana de 9 municipios, se estableció una seropositividad del 12,5% para leptospirosis humana (Agudelo *et al.*, 2007), dato muy similar al encontrado en una zona rural del municipio de Tierra Alta (Córdoba) donde se halló un 18% de seropositividad general (Restrepo *et al.*, 2007).

El CIDEIM de Cali encontró anticuerpos anti *Leptospira* en el 23,3% de las personas. Ellos hallaron asociación entre la seropositividad y el contacto con animales. De los 19 serovares evaluados, se detectó reactividad frente a 16, pero los títulos de anticuerpos fueron bajos (Ferro, *et al.*, 2006).

En perros callejeros de Cali, siete serovares fueron utilizados y el 56% de los casos positivos correspondió a infecciones con el serovar Icterohaemorrhagiae (Rodríguez *et al.*, 2004). Los serovares Pomona e Icterohaemorrhagiae fueron aislados de los riñones de *Rattus norvegicus*, también en el Valle del Cauca (Morales *et al.*, 1978).

Diecisiete cepas de *Leptospira* patógena se encontraron en el agua de fincas para cría de cerdos en la zona cafetera colombiana, en una plantación de café, pero no fueron caracterizadas hasta la categoría de serovar o especie (Giraldo *et al.*, 2002).

El estudio realizado por Agudelo-Flórez y colaboradores muestra el rol de las ratas como portadores naturales y propagadores de leptospiras patógenas en la Plaza Minorista de Medellín, Colombia. De 254 roedores identificados como *Rattus norvegicus*, el 25% y 20% fueron positivos por MAT y cultivo, respectivamente.

Barranquilla cuenta con un importante puerto marítimo y fluvial en la Costa Norte Colombiana y la ciudad está localizada a una altura de 14 m.s.n.m, en la desembocadura del Río Magdalena. La temperatura promedio anual es de 28°C y la ciudad cuenta con dos estaciones de lluvia, una de abril a junio y la otra de mayor intensidad de septiembre a noviembre (Romero-Vivas *et al.*, 2006). En el año 2004, se realizó un estudio para conocer los serovares de *Leptospira* circulantes en pacientes del departamento del Atlántico que consultaron desde el año 1999 a 2004, basados en los resultados obtenidos por el Laboratorio Departamental de Salud Pública y la información clínica colectada para cada paciente (Macías *et al.*, 2005). En este estudio 970 muestras simples de pacientes sospechosos con infecciones con *Leptospira spp* fueron analizadas usando como antígenos los serovares Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Hardjo, Grippotyphosa y Bovis. Alrededor del 10% (94/970: 9,7%) de las muestras aglutinaron para *Leptospira spp* y las más prevalentes fueron Icterohaemorrhagiae (62%: 58/94), seguida de Hardjo (12,8%: 12/94); sin embargo en 74,5% (70/94) de los sueros con títulos de 1:400 o mayores, se identificaron varios serovares en la misma muestra (Icterohaemorrhagiae

/Hardjo, Icterohaemorrhagiae / Hardjo-Bovis, Icterohaemorrhagiae / Canicola, etc). La mayoría de los pacientes fueron hombres (61%) entre los 15 y 45 años los síntomas más comunes fueron fiebre (91,7%), mialgia (72%), vómito/nausea (70,8%), dolor de cabeza (68,1%) e ictericia (63,9%). Algunos de los pacientes infectados con el serovar Icterohaemorrhagiae (8,6%), mostraron síntomas severos similares a la enfermedad de Weil, sin embargo no se registraron fatalidades en este período. El número de casos más altos se registraron en el año 2003 (N = 23), 2001 (N = 21) y 2002 (N = 18), y fueron más comunes en el periodo de lluvias (Agosto-Noviembre) y la mayoría de ellos ocurrieron en la capital del Departamento, Barranquilla (N = 46) y en el municipio de Soledad (N= 25).

La Secretaría Distrital de Salud de Barranquilla reportó desde marzo del 2004 hasta diciembre del 2009, 177 casos de morbilidad y 14 muertes en pacientes positivos para infecciones con *Leptospira interrogans* (s.l.), siendo los serovares Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Hardjo y Pomona los más frecuentemente aglutinados por sueros humanos (Tabla 4). Los barrios más afectados fueron: Buena Esperanza, El Bosque, Carrizal, La Manga, Las nieves Las Américas, Me Quejo, Por Fin, Rebolo, San José, San Roque, Santo Domingo, Siete de Abril, Villate (información suministrada por Pedro Arango, Secretaría Distrital de Salud Pública).

Información generada por un estudio realizado en el año 2008 (Romero-Vivas *et*

al, 2009) para caracterizar la presentación clínica en humanos a los que se les confirmó infección con diferentes serovares patógenos de *Leptospira*, a partir de 254 muestras pareadas con sus fichas clínicas y epidemiológicas; demostraron que estos pacientes presentaron síntomas similares a dengue durante los años 2000, 2007, 2008 y 2009 y 14,2% (36/254) de muestras que presentaron anticuerpos contra el género *Leptospira*, 91% (33/36) se confirmaron como infecciones recientes con serovares patógenos. Los serovares patógenos diagnosticados fueron Bratislava (serogrupo Australis= 7/33), Icterohaemorrhagiae (serogrupo Icterohaemorrhagiae= 5/33), seguida de Sarmin (serogrupo Sarmin= 5/33), Vughia (serogrupo Tarassovi= 4/33), Robinsoni (serogrupo Pyrogenes = 4), Bangkinang (serogrupo Autumnalis), Canicola y Pomona (2/33) cada una, Ballum, Grippotyphosa (1/33) cada una. Al paciente que falleció, sólo se le pudo tomar una muestra, la cual fue positiva para el serovar Vughia, con un título de 1:3.200.

Basados en la anterior revisión se infiere que son varias las publicaciones en población canina y roedores, sobretudo ratas, pero no son suficientes los que involucren el estudio simultáneo de ratas, ratones y perros en ambientes de alto riesgo a nivel urbano.

Nuestro trabajo está orientado en demostrar el rol epidemiológico de estos roedores y los perros en la circulación de serogrupos patógenos de *Leptospira* en la ciudad de Barranquilla, que por su ubicación estratégica y factores

climáticos, cuenta con un ambiente propicio para el mantenimiento del agente causal de leptospirosis. De esta forma se busca mostrar la importancia de estas especies en la transmisión de la enfermedad a la población humana.

Tabla 4. Casos de Leptospirosis humana en Barranquilla, año 2004 a 2009

Año	Pacientes	Fallecidos	* Método Diagnóstico	Serovares encontrados
2004	20	2	MAT	Bratislava, Canicola Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo
2005	17	1	MAT	Bratislava, Canicola Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo
2006	41	6	MAT	Bratislava, Canicola Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo
2007	66	4	ELISA -MAT	Bratislava, Canicola Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo,
2008	27	1	ELISA	No Aplica
2009	6	0	ELISA (S1)	No Aplica

* Los métodos diagnósticos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de la Secretaría Distrital del Salud Pública de Barranquilla. Cortesía de Pedro Arango (Secretaría Distrital de Salud Pública).

5.0 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar el papel epidemiológico que juega la población de roedores y caninos en la transmisión de serogrupos de *Leptospira* patógena, en barrios de la ciudad de Barranquilla donde se ha registrado casos de leptospirosis humana durante los últimos 6 años.

5.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1 Describir los factores ambientales presentes en las comunidades de estudio, que contribuyan con la transmisión de leptospirosis en el área.
- 5.2.2 Detectar infecciones activas con leptospirosis patógenas mediante ensayos de PCR y cultivo, en muestras de orina (perros) y macerado renal (roedores).
- 5.2.3 Obtener aislamientos de *Leptospira* patógena a partir de las muestras biológicas en los animales capturados, y puedan, una vez caracterizados a nivel de serovar y especie, ser utilizados en el panel diagnóstico local y nacional.
- 5.2.4 Describir los serogrupos de *Leptospira interrogans* s/l prevalentes en la población de roedores y caninos provenientes de las áreas de interés, mediante el Test de Aglutinación Microscópica (MAT).

- 5.2.5** Identificar las características clínicas de leptospirosis canina frente a los serogrupos diagnosticados en el estudio.
- 5.2.6** Determinar el papel epidemiológico de las dos especies de huéspedes a estudiar en la transmisión de *Leptospira* patógena a humanos.
- 5.2.7** Contribuir mediante charlas educativas al conocimiento de la enfermedad en diferentes ámbitos: comunidad, universidad y autoridades de salud.

6.0. MATERIALES Y METODOS

6.1 Tipo de estudio

Se llevo a cabo un estudio descriptivo transversal a partir de Noviembre de 2008 a Mayo de 2010.

6.2 Área de estudio

Se realizó en la ciudad de Barranquilla (Fig. 9 y 11), ubicada sobre la ribera occidental del río Magdalena, a 7,5 km de su desembocadura en el mar Caribe. Barranquilla se encuentra a una latitud 10° 59' 16" al norte de la línea ecuatorial y una longitud de 74° 47' 20" al occidente de Greenwich, tomando como referencia la plaza de la Paz, punto cero de la ciudad (Alcaldía de Barranquilla: <http://www.barranquilla.gov.co>). La ciudad es un puerto aéreo, marítimo, fluvial y de comunicaciones, tiene una extensión de 154 kilómetros cuadrados y más de un millón de habitantes (censo 2005, DANE). Los barrios seleccionados fueron: Las Américas, Por Fin y Rebolo y el criterio de selección se basó en el reporte de casos de leptospirosis humana (datos suministrados y confirmados por las autoridades de salud distrital) en los últimos 5 años (2004 a 2009).

Estas zonas de estudio cuentan con sectores socioeconómicamente deprimidos, pertenecientes a los estratos 1 y 2; además de poseer diferentes

poblaciones animales como son, gatos, perros, aves de corral y caballos que conviven en los mismos espacios y los últimos son utilizados para obtener ingresos económicos. Estos barrios también se caracterizan por presentar canales de aguas denominados popularmente “arroyos” que se desbordan especialmente en épocas de precipitaciones, arrastrando desechos y siendo fuente de infección para animales y personas (Fig. 10). Uno de estos barrios llamado Rebolo se encuentra próximo a la Sociedad Portuaria Regional de Barranquilla-Puerto de Barranquilla, de donde salen e ingresan barcos de procedencia nacional e internacional ([/www.colombiaexport.com/bacport.htm](http://www.colombiaexport.com/bacport.htm)).



Fig. 9. Ubicación de las aéreas de estudio en el mapa de Barranquilla. (Tomado y modificado de Google Earth On Line).



Fig. 10. Detalle de los arroyos que afectan las áreas de Barranquilla incluidas en el estudio. En el esquema C) se observa el gran arroyo que recorre el barrio Rebolo. Tomado y modificado del Centro de Consultoría de la Universidad del Norte (2007).



Fig. 11 . Areas de estudio. Notese los factores predisponentes que facilitan el contacto con el agente etiológico de la enfermedad. A) B) y C) Barrio las Americas. C) y D) Barrio Por Fin. E) Barrio Rebolo

6.3 Población de estudio

Para el cálculo del tamaño muestral de roedores y caninos se tuvo en cuenta la información suministrada por las autoridades de salud del distrito en el año 2007, el uso del programa Epi Info 6.0 y la tabla de selección de tamaño muestral para roedores según Faine *et al.*, 1999.

Las muestras de roedores y de caninos se obtuvieron luego de contar con el consentimiento por escrito de los habitantes de las viviendas y/o responsables de los perros (Fig. 12). El contenido de estos consentimientos se muestra en los Anexos 1 y 4.



Fig. 12. Diligenciamiento del consentimiento informado. Firma de la propietaria y habitante de la vivienda.

6.3.1 Población de roedores

La población de roedores incluyó las especies *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*. Para el cálculo del tamaño muestral y con un tamaño infinito de la población, se estimó 27% como el promedio de las prevalencias reportadas para roedores en Brasil (De Faria MT 2008), Baltimore (Vinetz J M, 1996) India (Priya C G, 2007) Gran Bretaña (Webster JP, 1995) y Hawaii (Higa H H, 1976) y un nivel de confianza del 95%.

Un total de por lo menos 45 roedores debían capturarse en el estudio (15 por barrio (Faine *et al*, 1999).

6.3.2 Población canina

Para el estudio de la prevalencia de las infecciones con *Leptospira interrogans* en la especie *Canis familiaris*, la cantidad de caninos estimada en cada barrio se obtuvo indirectamente por medio del número de vacunaciones en perros para la protección contra la rabia, realizado por el laboratorio de salud pública de Barranquilla, en los primeros meses del año 2007. Es así que el número estimado para el barrio Las Américas fue de 1.425; Por Fin: 1.097 y en Rebolo: 1.367. Para este número de perros y considerando una prevalencia menor (30%) a las reportadas en otras partes del mundo 37,8% (Detroit: Thierman, 1980) y 41,1%, (Cali: Rodríguez et al., 2004) se obtuvo un tamaño de muestra de 27 perros en total (9 perros/barrio) con un nivel de confianza del 95%.

6.4. Trabajo de campo

6.4.1 Captura de roedores

Para ejecutar el trampeo de remoción se contó con la participación activa de dos técnicos entrenados en el manejo adecuado de este tipo de animales. Fue necesario capturarlos vivos, para lo cual se utilizaron trampas de alambre fabricadas artesanalmente y algunos ejemplares de trampas comerciales Sherman ® para atrapar las ratas. En el trampeo de ratones solamente se

emplearon trampas comerciales (Humane mouse trap, CATCHMASTER) (Fig. 13).



Fig. 13. Cebo y trampas utilizadas en la expedición de trampeo. A) Cebo hecho a base de avena y mantequilla de maní (Mills J, 1998) B) trampa artesanal para capturar ratas C) trampa comercial para atrapar ratones.

El acercamiento a las viviendas se realizó teniendo en cuenta aquella en donde se reportaron los casos humanos de leptospirosis y las casas aledañas a estos; de igual forma se confirmó la presencia de heces y rastros de roedores en estos predios y la presencia de otro tipo de animales domésticos y de trabajo, ya que los restos de alimentos suministrados a los caballos y perros atrae la constante presencia de roedores, así mismo los corrales de gallinas son apetecidas por las ratas.

Al inicio de cada expedición de trampeo se diligenció una ficha que incluyó información acerca de las viviendas y sus alrededores, tales como material de construcción, suministro de servicios públicos, convivencia con animales domésticos y recorrido de arroyos (Anexo 2). De acuerdo con estas

descripciones las trampas de remoción fueron puestas en lugares de la vivienda frecuentados por roedores en busca de alimentos, tanto al interior de la cocina, techo, alacena, cerca a canecas de basura, dentro de los dormitorios, incluyendo los guardarropas (Fig.14) así como al exterior de la vivienda: patios con acúmulos de material, cerca a las letrinas (Fig.15), entre ellos las caballerizas, gallineros y depósitos de alimentos (Fig.16). El paso del animal era identificado por los residuos biológicos dejados a su paso tales como orina, heces o basura traída desde otros lugares como huesos secos, conchas de vegetales o piezas de tela para hacer madrigueras (Fig. 17 y 18).



Fig. 14. Sitios estratégicos de trampeo al interior de las viviendas. A) Trampas puestas en la parte interna de los techos. B) Cocina. C) Acopio de materiales (partes de televisores, cables y equipos de sonido viejos ubicados en la sala de una vivienda)



Fig. 15. Sitios estratégicos en los patios de las viviendas. A) y B) Detalle de la madriguera de ratas hallado en el patio de una casa) Pozo séptico D) conexión para eliminación de aguas servidas.

El cebo para atraer los roedores a la trampa se preparó a base mantequilla de maní y avena en hojuelas como sugiere el Manual para trampeo y muestreo de pequeños mamíferos realizado por Mills *et al*, 1998. El trampeo se realizó en las tardes durante 4 días consecutivos y se las dejaba toda la noche para ser revisadas y recogidas a la mañana siguiente. Cuando la trampa era visitada por un roedor esta se cerraba de tal forma que podía transportarse vivos dentro de bolsas plásticas con el roedor atrapado al interior de la trampa. Luego eran llevados a la universidad del Norte con la seguridad exigida en este caso (Mills *et al*, 1998).



Fig. 16. Sitios estratégicos de Trampeo en las caballerizas. En las fotos A y B se observa los sacos de alimento concentrado para caballos apetecido por roedores, por lo cual las trampas se colocaron en las bodegas de almacenamiento. C) En el interior de los techos ya que los roedores eran vistos caminando sobre los listones de madera. D) Trampas puestas donde permanecían los pollos y gallinas.



Tomado y modificado de la presentación Ratas y Ratones. Autor: William Dale. PhD

Fig. 17. Forma de las heces para la determinación de especies de roedores sinantrópicos



Fig. 18. Otros lugares de trapeo. A) Próxima a caneca de basura. B) La flecha señala el agujero en la pared por donde ingresan roedores a la vivienda, además muy cerca a los utensilios de cocina para lavar. C) Entre piedras y materiales de construcción.

6.4.2 Captura de perros

En esta fase del proyecto se contó con el acompañamiento de un técnico de la Secretaría Distrital de Salud de Barranquilla para la ubicación de las viviendas, lo que permitió localizar las personas y/o familiares afectadas por leptospirosis en las áreas visitadas. Para la colección de muestras se contó con la labor de personal capacitado en el manejo y buen trato de perros, tales como estudiantes de medicina veterinaria (Fundación Universitaria San Martín, seccional Barranquilla) y un técnico agropecuario (SENA).



Fig. 19. Captura de caninos en las áreas de estudio. A) y B) destaca el acercamiento a las comunidades para dar a conocer el estudio y proporcionar educación concerniente a la enfermedad. C) Notese el contexto epidemiológico que favorece la transmisión de *Leptospira*. D) E) y F) Participación voluntaria y masiva de la comunidad al momento de seleccionar la población canina.

Las muestras se colectaron a partir del día 5 de noviembre de 2008 a 3 de diciembre del mismo año (Fig.19). Al momento de estudiar el ejemplar canino se dialogó con una persona adulta responsable del perro para obtener información del animal y diligenciar debidamente el consentimiento informado. Los criterios de inclusión fueron: perros provenientes de manzanas en donde Distrisalud reportó casos o fallecimientos por leptospirosis, aquellos que presentaran signos y síntomas de leptospirosis canina como espalda arqueada, vómito, sangre en la orina o en las heces (Faine, 1999) o que simplemente fueran callejeros. Los perros eran capturados usando collares y bozales (Fig.20).



Fig. 20. Forma correcta de capturar perros callejeros para evitar mordeduras. A) Tubo artesanal provisto de una soga denominado “lazo atrapa perros” B) Uso de cuerdas o bozales para realizar el examen físico y tomar las muestras.

Luego de la selección del animal se procedió a un examen físico para determinar características clínicas como riñones inflamados, ictericia, espalda arqueada, fiebre, entre otras (ver Fig. 21 y Anexo 5).



Fig. 21. Examen físico del perros

6.5 Obtención de muestras

6.5.1 Obtención de muestras en roedores

En el bioterio de la Universidad del Norte se administró intramuscularmente la anestesia Zoletil a una dosis de 100mg/Kg, que es la combinación de un agente anestésico disociativo compuesto por clorhidrato de Tiletamina y un tranquilizante del grupo de las benzodiacepinas, clorhidrato de Zolazepam (Zoletil 50 Laboratorios Virbac S.A) utilizando agujas calibre 0,45x10 mm (Becton Dickinson de Colombia) logrando su inmovilización para proceder a la punción intracardiaca con aguja hipodérmica 23Gx1" (Becton Dickinson de Colombia) en roedores pequeños y agujas 21Gx1½" (Becton Dickinson de Colombia) en roedores grandes, desinfectando antes con alcohol al 70% el sitio de la punción. Las muestras de sangre total obtenidas se depositaron en crioviales estériles (NALGEN) para continuar con la centrifugación a 3500 RPM durante 10 minutos y separar el suero que se conservó a -85°C hasta completar todas las capturas para luego realizar el estudio serológico.

En esta fase se registraron características físicas tales como: talla, peso, género y especie en los formularios diseñados para este fin (Anexo 3). Para determinar la especie de las ratas capturadas se analizaron características como el color del pelo, la longitud de la cola, el largo del cuerpo, forma y tamaño de las orejas y la forma de las heces (Tabla 5). Para diferenciar el sexo

Se tuvo en cuenta las características como testículos, orificios genitales e indicio de lactancia.

Tabla 5. Características Físicas para diferenciación de ratas

Características	<i>Rattus rattus</i> (rata negra)	<i>Rattus norvegicus</i> (rata marrón)
Base de la cola	Menos gruesa	Más gruesa
Color del pelaje	negro, gris claro con gris oscuro abdomen: blanco con gris	Pardo, gris parduzco
Habilidades	buena trepadora	buena nadadora
Hocico	Más puntudo	Menos puntudo (Cilindrico)
Longitud de la cola	Mas larga que el cuerpo	Mas corta que el cuerpo
Longitud del cuerpo	7-8 pulgadas (promedio)	11 pulgadas (promedio)
Orejas	grandes y onduladas	Mas pequeñas y cubiertas de pelo
Patas	orde con el tamaño del cuerpo, color mas osc	pata gruesa y color oscuro (habitat)
Peso	150-200 gramos (promedio)	400-800 gramos (promedio)
Presencia de anillos en la	no	si

Tomado y modificado de Koehn Darcy. A Survey of Rat Populations at Springfield Plantation.2003

Después de realizar la extracción de sangre cada roedor se sumergió durante 10 minutos en una solución yodada al 10% (Preparado y comercializado por Droguerías Juliao), se introdujo en la cabina de seguridad biológica clase III (C4: Compañía de Control de Contaminación, Colombia) y bajo efectos de la anestesia (los que quedaban vivos después de la extracción de sangre) se le

practicó dislocación cervical y disección, con la finalidad de extraer los riñones de cada ejemplar en una caja de Petri (PALL. Distrumédica S.A) desechable (Fig. 22). Las cajas de Petri con riñones correspondiente a cada ejemplar se transportaron a la cabina de seguridad biológica clase II.

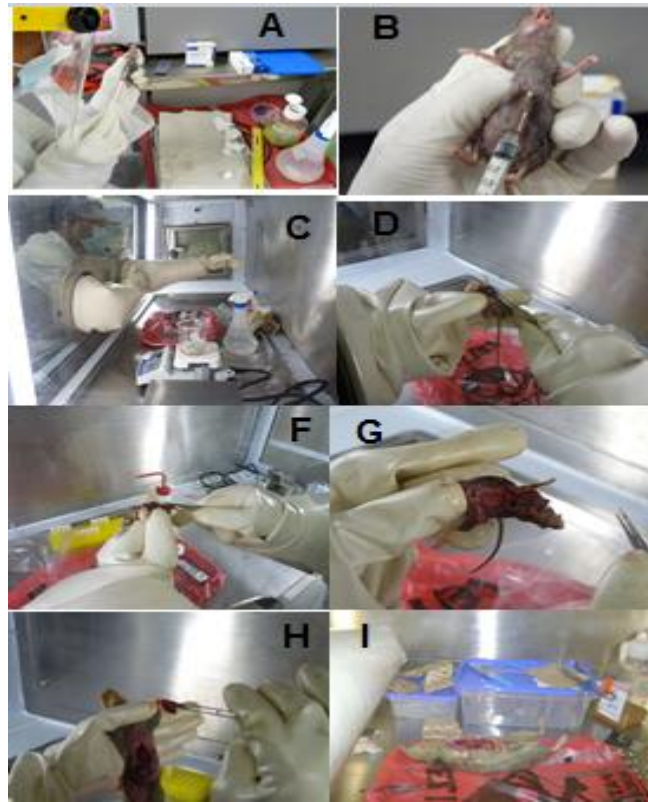


Fig. 22 . Proceso de obtención de muestras en roedores. A) Aplicación de anestesia y estudio de características físicas .B) Punción cardiaca. C)Disección del roedor al interior de la cabina de bioseguridad clase III. D) E) F) G) H) I) Extracción de riñones en ratones y ratas.

6.5.2 Obtención de las muestras en caninos

Las muestras de sangre (4 ml en promedio) se colectaron por punción en la vena cefálica con el uso de tubos de vidrio al vacío sin anticoagulante (BD

Franklin Lakes NJ USA) y agujas calibre 21G X 1/2 (Becton Dickinson de Colombia), previa desinfección con alcohol al 70% (Fig.23).

En la obtención de las orinas se empleó el diurético Furosemida (Diurivet, Provet) para inducir su formación y realizar la cistocentesis, utilizando para esto jeringas desechables de 10 ml y agujas 21 G X 1 1/2 (Becton Dickinson de Colombia) previa desinfección utilizando yodo (Fig. 23). Una vez obtenida la muestra de orina a cada perro (8 ml en promedio), se depositó en un frasco colector desechable, guardando las medidas de esterilidad con el uso de un mechero de alcohol. El transporte de las muestras al Laboratorio de Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte se realizó en neveras de Icopor a temperatura ambiente, antes de transcurridas dos horas, contadas a partir de la primera orina obtenida.

En el laboratorio los tubos con sangre venosa coagulada se centrifugaron a 3.500 RPM durante 10 minutos para separar el suero. Luego se depositó cada suero en crioviales (NALGENE) rotulados con el numero asignado a la muestra, fecha de obtención y sector de muestreo.

La conservación de los sueros se realizó inmediatamente a una temperatura de -85°C para realización de MAT cuando se colectaran todas las muestras requeridas.



Fig 23. Proceso de obtención de muestras en caninos. A) B) C) Valoración de las características clínicas del perro. D) E) F) Flebotomía en vena cefálica. G) H) I) Método de cistocentesis para minimizar la contaminación de las muestras de orina.

Los recipientes que contenían la orina se mezclaron por inversión y se centrifugaron en tubos plásticos (Falcon) de 50 ml por un tiempo aproximado de 10 minutos a 3900 RPM.

Finalizado este proceso se descartaron los sobrenadantes de los tubos y se resuspendieron los sedimentos con 3 ml amortiguador PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X estéril. Una muestra de este sedimento resuspendido se

almacenó a -85°C con la finalidad de ser analizado por métodos de biología molecular en etapas posteriores.

6.6 Cultivo de muestras biológicas

6.6.1 Preparación de los medios de cultivo

Para llevar a cabo los cultivos de macerado renal a partir de roedores y orinas de perros, previamente se prepararon los medios de cultivo artificiales para aislamiento de *Leptospira*, como son el medio líquido EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) y el medio semisólido Fletcher en el Laboratorio de Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte.

Para la elaboración del medio de cultivo líquido EMJH se pesó en una balanza analítica (Sartorius) 0.23g de Medio Base EMJH (Becton Dickinson and Company) que contiene fosfato de sodio dibásico, fosfato de potasio monobásico, cloruro de sodio, cloruro de amonio y tiamina en un frasco estéril de 250 ml (Schott Duran). Usando una probeta de 100 ml se midió 90 ml de agua milliQ y se adicionó al recipiente con el medio base EMJH. Esta solución se mezcló hasta disolver.

La esterilización se hizo en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Cuando la temperatura disminuyó a 50°C se agregó 10 ml del medio de enriquecimiento EMJH (contiene albumina, polisorbato 80 y factor de crecimiento para *Leptospira*) previamente filtrado, usando un filtro de 0,22 µm de porosidad

(MILLEX®, Millipore Expres ® PES Membrane). Este paso se realizó en la cabina de bioseguridad clase II (C4: Compañía de Control de Contaminación, Colombia).

Tres ml del medio de cultivo recién elaborados se envasaron en tubos estériles de vidrio tapa rosca de 10 ml de volumen (Pirex). Al finalizar el proceso se obtuvo un producto con pH 7,4 \pm 2 (medidor de Ph: marca WTW) y de apariencia translúcida.

Para preparar el medio de cultivo EMJH con 5`Fluorouracilo (Medicamento Esencial: Rapsohn Therapeutics Ltda), el cual actúa como antimetabolito que interviene en la síntesis de ADN, se adicionó este producto al medio EMJH enriquecido para una concentración final de 0,4 mg/ml (después de esterilizar). Se hizo control de pH, esterilidad y desempeño microbiológico (Fig. 24).

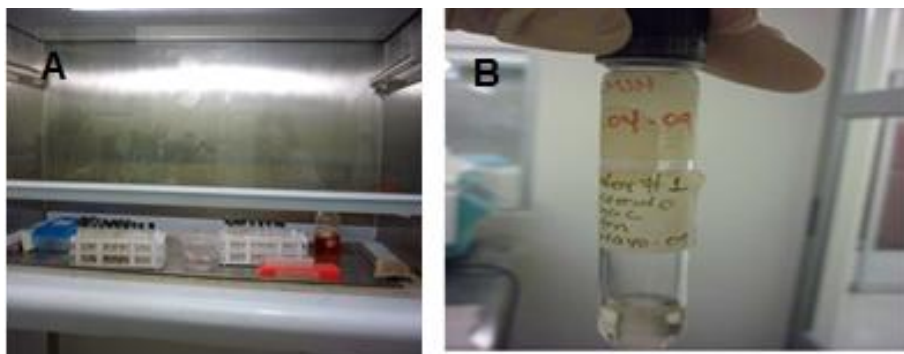


Fig. 24. Medio de cultivo EMJH. A) Preparado y servido en la cabina de bioseguridad clase II (Laboratorio de Enfermedades Tropicales. B) Tubo con medio de cultivo EMJH rotulado para ser sembrado con muestra de macerado renal.

En la preparación del medio de cultivo semi-sólido Fletcher 0,27g de Medio base Fletcher (Becton Dickinson and Company) el cual está compuesto por peptona, extracto de carne, cloruro de sodio y agar, se depositaron en un frasco (Schott Duran) estéril y se adicionaron 90 ml de agua MilliQ. Esta mezcla disuelta se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Al descender la temperatura a 50°C se agregó 10 ml del medio de enriquecimiento EMJH previamente filtrado, usando filtro de 0,22 µm. Al finalizar el proceso, el producto tuvo apariencia translúcida con un pH 7,9 +/- 0,2. Se prepararon lotes de tubos que contenían 3 ml de medio de cultivo, almacenados en el refrigerador (HACEB) inmediatamente. El control de calidad se realizó incubando a 28°C durante 72 horas un tubo con medio sin sembrar y otro tubo con un serogrupo de *Leptospira*.

6.6.2 Cultivo de muestras en roedores

Una vez obtenidos los riñones del roedor dentro de la cabina de bioseguridad clase III se transportaron en una caja de Petri estéril y se maceraron utilizando hojas de bisturí numero 21 (CE) y buffer PBS 1X (Fig.26). El proceso de disección y cultivo se realizó simultáneamente para asegurar la supervivencia bacteriana (Fig.25). Para el procedimiento de cultivo se tomaron 600µl de la solución, producto del triturado y se cultivaron 200µl en cada uno de los tubos que contenían los medios EMJH, EMJH-5`FU y Fletcher.

La incubación de los cultivos se realizó a una temperatura que oscilaba entre 28°C a 30°C. 1 ml de este macerado se conservó -85°C para realización de PCR (Fig. 26).



Fig.25 Procedimiento para obtención de riñones y cultivo del macerado renal. A) Disección de roedores dentro de la cabina de seguridad biológica clase III) B) Macerado renal y siembras se realizó en la cabina de bioseguridad clase II. C) Detalle de los cultivos de macerado renal. Cada muestra se sembró en medio EMJH, EMJH 5'FU y Fletcher por duplicado (6 tubos por muestra).

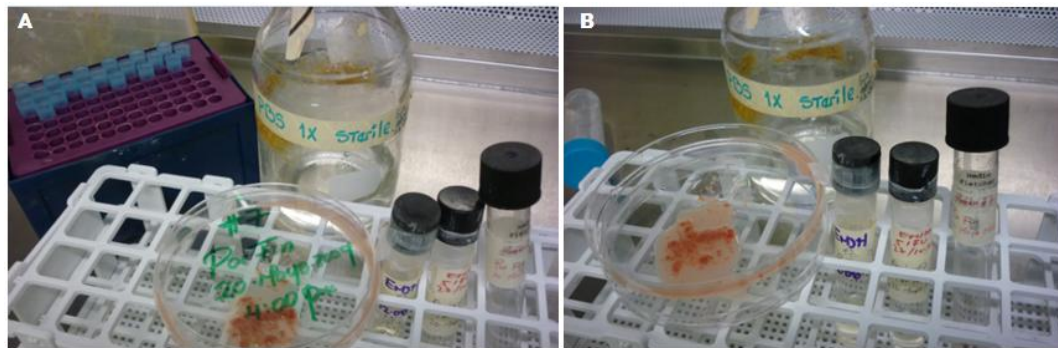


Fig. 26. Macerado renal para ser sembrado en los medios de cultivo EMJH, EMJH-5'FU y Fletcher.

6.6.3 Urocultivos en caninos

El sedimento reconstituido con buffer PBS 1X se filtró utilizando una membrana desechable de 22µm de porosidad (Millipore Corporation. Bedford USA) y

jeringa desechable con capacidad de 10 ml. Diluciones 10X de la muestra anteriormente filtrada desde 1:10 hasta 1:10.000 fueron preparadas en PBS 1X, para sembrar 200 µl de las dos primeras diluciones en medio líquido EMJH y 200 µl sin diluir en un tubo del medio semisólido Fletcher por cada muestra de orina (Fig. 27).

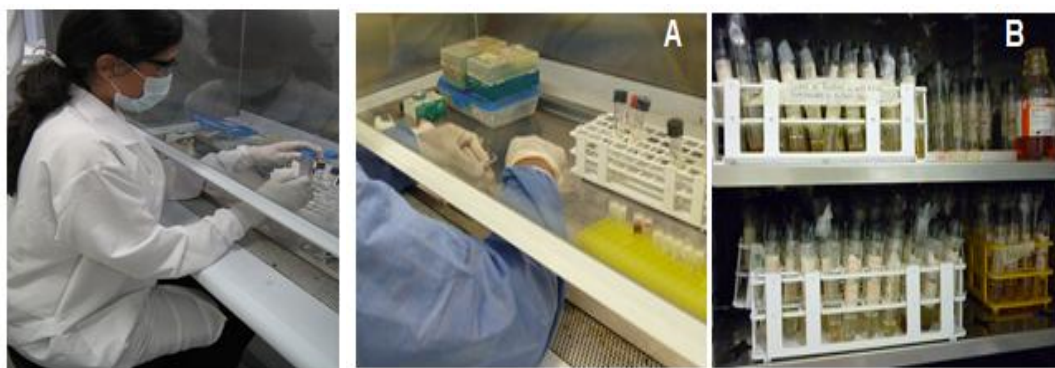


Fig. 27. Cultivo de orina en perros. A) 200 µl cada sedimento urinario diluido en PBS 1X se sembró en los medios de cultivo para *Leptospira* dentro de la cabina clase II. B) Cada muestra fue sembrada en 2 medios de cultivo EMJH y 1 medio de cultivo Fletcher (3 tubos de cultivo por cada muestra).

Durante los primeros cuatro meses, se revisaron los cultivos de orina y macerado renal semanalmente luego la revisión se realizó mensualmente, utilizando el microscopio de campo oscuro (Nikon Eclipse E 200). Se buscaron bacterias con las características morfológicas y de movimiento propias del género *Leptospira*, con el fin de caracterizar hasta el nivel de serovariedad, en un laboratorio internacional los aislamientos obtenidos en la ciudad de Barranquilla (Datos no mostrados y obtenidos por la Dra. Claudia Romero).

A los cultivos sospechosos de aislamiento se realizaba subcultivo en los medios ya mencionados cada 15 días y el seguimiento se llevó a cabo durante 12 meses. La temperatura promedio utilizada para la incubación fue de 29°C (rango entre 28°C-30°C) (Fig. 28).



Fig. 28. Incubación de los cultivos. A) La incubadora ubicada en la parte superior permanecía con una temperatura que oscilaba entre 28-30°C para permitir el crecimiento de *Leptospira interrogans*. B) y C) Numero de tubos que semanalmente debían ser revisados en busca de aislamientos de *Leptospira* (549 tubos en total, entre los que se encontraban EMJH, EMJH-5FU y Fletcher sembrados con muestras renales y de orina).

6.7 Determinación de la presencia de *Leptospira interrogans* *sl* en las muestras animales y de aislamiento mediante ensayos moleculares

La presencia de *Leptospira patógena* en muestras de roedores y caninos se determinó mediante la detección y amplificación de un segmento de 423 bp del gen que codifica la proteína LipL32 presente únicamente en las leptospiras patógenas y propuesta por Levett (Agudelo-Florez, 2009).

6.7.1 Extracción de ADN en roedores y caninos

En roedores y perros la extracción de ADN genómico se aplicó todos los cultivos de los macerados renales, macerados renales conservadas a -80°C y

sedimentos de orina provenientes de roedores y perros respectivamente (Fig.30). Para esto se siguió el protocolo de purificación de ADN descrito por la casa comercial QIAGEN (Qiamp DNA minikit), usando como control positivo el cultivo del serogrupo patógeno Bataviae y como control negativo el cultivo del serogrupo saprófito Patoc.

A tubos Eppendorf de 2 ml se depositó 20 µl de proteasa (QIAGEN), 200 µl de cada una de las muestras y 200 µl de buffer AL de lisis; después de mezclar por vortex durante 15 segundos se incubó durante 10 minutos a 56°C.

Luego de remover gotas, se adicionó 200 µl de etanol al 100% (Merk) y la mezcla se transfirió cuidadosamente a una columna provista por el kit, centrifugando por 8000 rpm durante 1 min. Después de descartar el filtrado, se adicionó 500 µl de buffer de lavado AW1, se centrifugó nuevamente a 8000 rpm por 1 min y se agregó 500 µl de buffer de lavado AW2, centrifugando a 14.000 rpm durante 3 min.

Al descartar el filtrado y colocar la columna en un tubo de 2 ml limpio, se agregó 200 µl de buffer de elución AE e incubó a temperatura ambiente por 5 min, para luego ser centrifugada a 8000 rpm por 1 min.

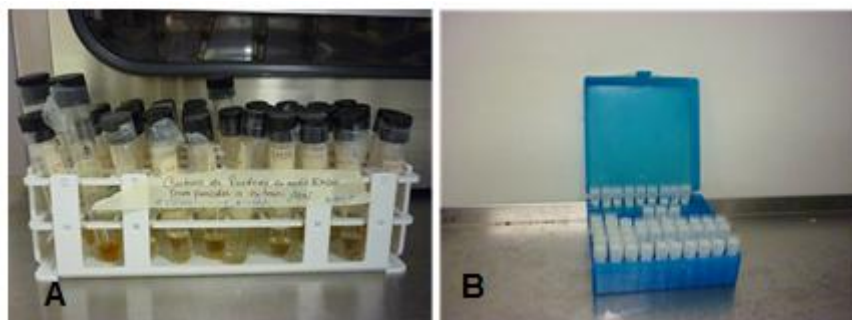


Fig. 29. Muestras para extracción de ADN genómico. A) cultivos de macerado renal. B) Alícuotas de cultivos caninos.

La concentración de ADN fue medida a partir de una dilución 1:50 en agua destilada en el espectrofotómetro U.V- Visible (Biomate 3. Thermo Spectronic) a una longitud de onda entre 260-280 nm (Fig. 31).

El resto de las muestras de ADN fueron almacenadas a temperatura de -20°C hasta el momento de su uso en técnicas de PCR.

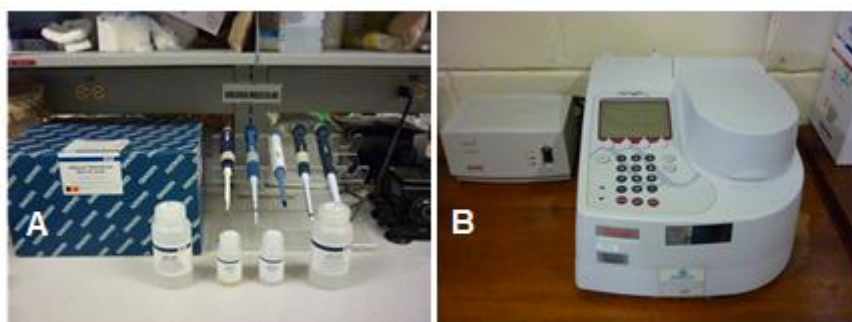


Fig. 30. Reactivos y equipos utilizados para pruebas de biología molecular. A) Qiamp DNA minikit. B) Espectrofotómetro U.V- Visible (Biomate 3. Thermo Spectronic) cedido gentilmente por el Laboratorio de Virología de La Universidad del Norte.

6.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Los iniciadores fueron fabricados teniendo en cuenta la secuencia del gen *lipL32*, los cuales se encuentran localizados entre la posición 270 y 690 de este gen (Integrated DNA Technologies) y de acuerdo con lo descrito por Levett (2005). La secuencia de los iniciadores es la siguiente:

LipL32-270F (5`CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-3`) y

LipL32-692R (5`-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3`).

Estos cebadores fueron diseñados para regiones conservadas sin bases mixtas utilizando Oligo 6.0 Biología Molecular Insights (Levett, 2005).

El producto de amplificación correspondiente al gen *lipL32* fue de 423 pb. Para las condiciones de amplificación se siguió el protocolo publicado por Agudelo-Flórez *et. al*, 2009. Brevemente en un tubo de 200 µl (USA SCIENTIFIC) se obtuvo un volumen total de 50 µl cuando se mezclaron 0.025 µl de cada iniciador a una concentración de 0,1 µM (Integrated DNA Technologies), 5 µl de ADN (3-12µg), 0,2 µl de Taq polimerasa a una concentración de 1 UI (Biolase DNA Polimerasa. Bioline), 2,5 µl de solución tampón 10X (Bioline), 1,5 µl de MgCl₂, cuya concentración fue 3 mM (Bioline), 0,625 µl de dNTPs con concentraciones individuales de 25 mM (Bioline) y 15,13 µl de agua.

Para llevar a cabo el proceso de amplificación de ADN se empleó un termociclador BIO-RAD (AM LTDA) programado con 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C, seguido de un segundo ciclo que incluyó un primer paso de 94°C por un minuto, segundo paso de anillamiento a 55°C durante 1 minuto y un tercer paso de extensión final a 72°C por 5 minutos. El segundo ciclo se repitió 35 veces (Fig. 32). Finalmente los productos de PCR se conservaron a 4°C para su posterior análisis.



Fig. 31. Reacción en Cadena de la Polimerasa. A) Muestras de ADN sometidas a amplificación por PCR. B) y C) Termociclador del laboratorio Multifuncional de La Universidad del Norte programado previamente.

6.7.3 Gel de agarosa y determinación de la banda de 423bp

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% (Life Technologies, Paisley, Escotland), teñidos con Bromuro de Etidio (Bromuro Plus one. Pharmacia Biotech) en buffer TAE 1X a 100 Voltios durante 2 horas en una cámara de electroforesis (C.B.S Scientific Co). Los pozos del gel introducidos en buffer TAE 1 X dentro de la cámara fueron sembrados en un orden que incluyó primero el marcador de peso molecular de 50 pb o 100 pb

(Fermentans), seguido de 10 µl de ADN control positivo mezclado con 2 µl de buffer de carga. De igual forma se sembraron todos los productos de PCR en estudio, así como los controles negativos (Serogrupo saprófito y agua). Dos transiluminadores UV (BIORAD y BioDoc-it™) se usaron para visualizar las bandas del gel (Fig.33).

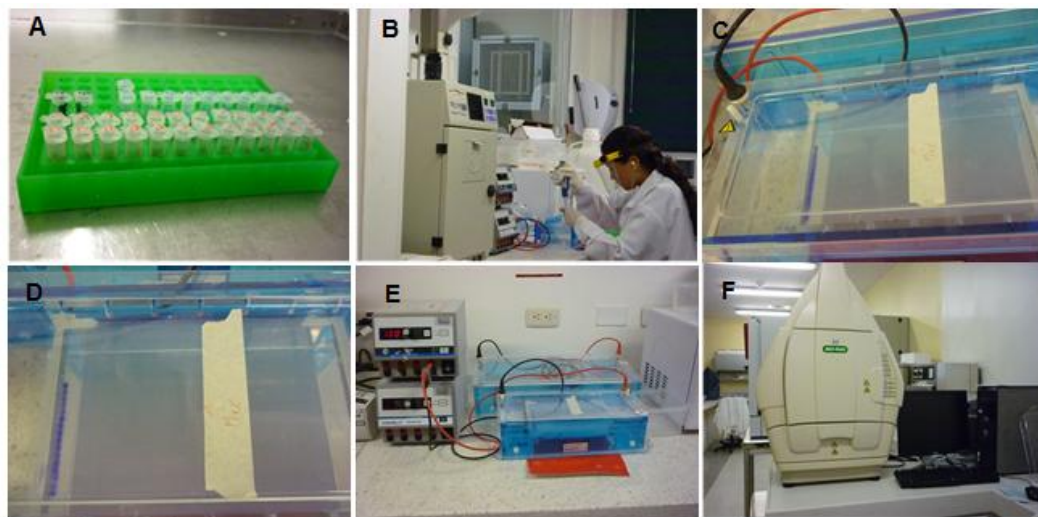


Fig. 32 Detección de productos de amplificación. A) Algunos productos de PCR. B) C) D) E) Pasos para llevar a cabo la revelación de los productos de PCR. F) Visualización de la banda de 423bp (Levett et al), utilizando transiluminador del Laboratorio Multifuncional, así como el transiluminador de GIENTROP (Foto B).

6.8 Realización de Pruebas Inmunológicas

6.8.1 Realización de Prueba de Microaglutinación (MAT)

Serogrupos de *Leptospira*

Se usaron 25 serovares de referencia internacional, incluidas 24 patógenas y 1 saprófita●, las cuales fueron donadas por Herford Hospital *Leptospira* Reference Lab (Inglaterra) y mantenidas en el laboratorio de Enfermedades

Tropicales en los medios EMJH y Fletcher e incubadas a 28°C (Tabla 6). El repique de cada serovar en el medio EMJH se realizó con una semana de anterioridad a la ejecución de cada prueba de Microaglutinación (MAT), para lograr el crecimiento bacteriano con una densidad celular equivalente a escala de MacFarland 0,5.

Tabla 6. Serovares empleados en la prueba MAT

Serogrupo	Serovar	Cepa
Australis	Bratislava	Jez Bratislava
Autumnalis	Bankinang	Bankinang I
Ballum	Ballum	Mus 127
Bataviae	Bataviae	Van Tienen
Canicola	Canicola	Hon Ultrech IV
Celledoni	Anhoa	LT 90-68
Cynopteri	Cynopteri	3522C
D'jasiman	D'jasiman	D'jasiman
Fainei	Hurstbridge	BUT 6
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Duyster
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdoamdis
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Icteri 1
Lousiana	Lousiana	LSU 1945
Manhao	Lincang	L 14
Mini	Georgia	LT 117
Panama	Panama	CZ 214K
Pyrogenes	Robinsoni	Robinson
Pomona	Pomona	Pomona
Ranarum	Ranarum	ICF
Sarmin	Sarmin	Sarmin
Semarangae	Patoc	Italian
Serjoe	Hardjo	Hardjoprajitno
Serjoe	Jin	A 81
Shermani	Shermani	1342K
Tarassovi	Vughia	LT89-68

6.8.2 MAT en roedores y perros

A los sueros colectados en roedores y perros se realizó una dilución 1:5 y 1:25 respectivamente, con buffer PBS 1X estéril para hacer MAT género específica con *L. interrogans* serovar Patoc.

El control negativo consistió en el uso de un suero negativo para *Leptospira* de roedor o perro según el caso. Los sueros en los que se observó una aglutinación $\geq 50\%$ respecto al control negativo se enfrentaron a 24 serovares de *L. interrogans* de acuerdo con la Tabla 6.

Para probar cada serogrupo patógeno se utilizaron placas de microtitulación plásticas de 96X96 pozos, fondo plano (Immunolon), marcadas con un código asignado a cada suero, previa realización de diluciones seriadas desde 1:5 hasta 1:160 en muestras de roedor y 1:25 hasta 1:25600 en sueros caninos; para esto se usó una pipeta multicanal (Brand) (Fig.29). Acto seguido se depositó el antígeno correspondiente al cultivo del serovar listo en ese momento (revisado microscópicamente para ver si no presentaba aglutinaciones que interfirieran con los resultados) y que cumpliera con las especificaciones requeridas por la prueba; esta mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas para que las bacterias vivas reaccionaran con los anticuerpos presentes en los sueros. En este paso las placas de microtitulación se

introdujeron en cámaras húmedas elaboradas con recipientes plásticos provistos de tapas (ESTRA). Al cabo de dos horas las cámaras húmedas se retiraron de la incubadora para servir en las láminas para inmunofluorescencia (CEL-LINE/ERIE SCIENTIFIC CO = 10 pozos) limpias y desengrasadas con alcohol al 70% (MK), se depositaron 10µl del contenido de cada pozo de la placa de microtitulación (correspondiente a todas las diluciones de cada suero) para ser leídas inmediatamente con ayuda del microscopio de campo oscuro, utilizando todos los objetivos de aumento en cada lectura para no dejar escapar detalles (10X, 20X, 40X).

La dilución más alta en donde se observó con aumento de 20X, aglutinación de $\geq 50\%$ de leptospiras, comparado con el control negativo, fue considerada como punto final de la reacción antígeno-anticuerpo. Los sueros se consideraron positivos a una dilución mayor o igual a 1:40 para roedores y 1:100 para los perros, de tal forma que estuvieran hasta 4 y 3 veces diluido respectivamente, para evitar el mayor número de reacciones cruzadas y siguiendo puntos de corte similares a los sugeridos en otros estudios (Agudelo *et al.*, 2009, Rodríguez *et al.*, 2004).

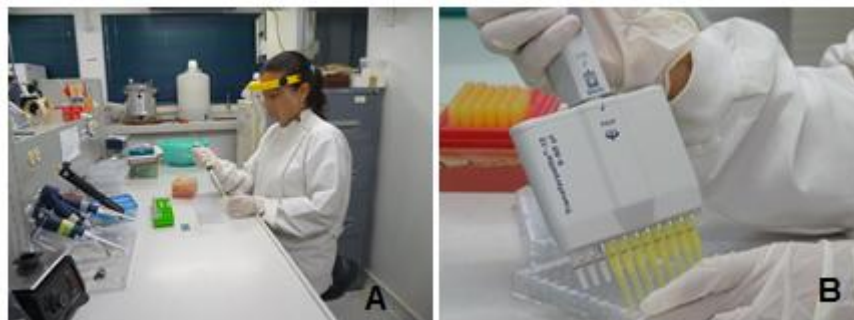


Fig. 33. Realización de MAT. A) y B) Dilución de los sueros en placas de microtitulación para luego adicionar las bacterias de acuerdo con el serogrupo de *Leptospira* a probar.

6.9. Contribución al conocimiento de la enfermedad

6.9.1 Habitantes de las aéreas estudiadas:

Por medio de folletos plegables realizados con el programa Microsoft Office Power Point 2007, e impresos con tinta a color (canon), papel bond y trampas a utilizar, se dieron a conocer aspectos generales de la enfermedad, haciendo especial énfasis en su transmisión y modo de prevención; se citaron a la reunión todos los habitantes del sector (Pablo Maldonado, DISTRISALUD).

En esta ocasión hizo su intervinieron la Dra. Claudia Romero-Vivas y Margaret Cuello Pérez en los aspectos antes mencionados y el Señor Pablo Maldonado miembro de DISTRISALUD, en el tema referente a los hábitos de los roedores. (Fig. 34 y 35).



Fig. 34. Educación a la comunidad. En A B y C se observa la asistencia de madres de hogares comunitarios, profesores y estudiantes a la charla dictada por la Dra. Romero-Vivas.



Fig.35. Charla acerca de roedores. A) Instrucciones generales acerca de la transmisión de la enfermedad por medio de plegables ilustrados. B) Técnico de DISTRISALUD explicando los hábitos de los roedores.

6.9.2. Congresos, Simposios y encuentros investigativos

En el II encuentro de investigadores celebrado en las instalaciones de la Universidad del Norte el día 4 de Mayo de 2010, se dio a conocer los resultados de este proyecto, además de los obtenidos en los sueros humanos como marco del gran proyecto inicial. Se presentaron los resultados a la comunidad científica presente en el evento y a los estudiantes de la división Ciencias de la Salud (Universidad del Norte) que se acercaban al stand, donde

se contó con la ayuda de un poster y un computador portátil (DELL) para dar a conocer el proyecto.

Con los datos preliminares obtenidos en los caninos se participó en el XIV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical, realizado en la ciudad de Medellín durante los días 8, 9, 10 y 11 de Octubre de 2009, bajo la modalidad ponencia de poster (diseñado con el programa Microsoft Office Power Point y Corel).

6.9.3 Autoridades de salud

Los resultados obtenidos en el trabajo realizado con caninos, se entregaron personalmente en un informe parcial escrito el 16 de Octubre de 2009, a los departamentos de Zoonosis, Oficina de Salud Pública y Enfermedades Transmitidas por Vectores de la Secretaria de Salud Pública de Barranquilla. A esta misma entidad la Dra. Claudia Romero-Vivas realizó una presentación oral el 9 de Octubre de 2010 en instalaciones de la universidad del Norte para rendir el informe final que incluyó los datos encontrados en roedores, perros y humanos (Romero-Vivas et al.; Biomédica, 2009).

7.0 Consideraciones Éticas

Todos los animales incluidos en este estudio se trataron de acuerdo con lo contemplado en la ley 84 del 27 de diciembre de 1989, por la cual se adopta el

Estatuto Nacional de Protección de los Animales, se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia.

8.0 Análisis de datos

Los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio se almacenaron en una base de datos, utilizando libros del programa Microsoft Office Excel, para los que requirieron análisis de variables se utilizó el programa estadístico Epi Info 6.0. La concordancia entre las pruebas de detección directa de *Leptospira* (cultivo y PCR) en roedores fue medida con *kappa*.

9.0 Resultados

9.1 Áreas de estudio

9.1.1 Descripción de las Áreas y viviendas donde se realizaron las capturas

El estudio se realizó en 3 barrios de Barranquilla que pertenecen a las localidades: metropolitana (Las Américas), suroccidente (Por Fin) y suroriente (Rebolo), los cuales se ven afectados por diferentes arroyos durante la época de lluvia (Figs. 2 y 10).

9.1.1.1. Descripción de las viviendas del barrio Las Américas

Las calles del barrio Las Américas se encontraban sin pavimentar durante la fecha en que se realizó el muestreo, se observó que después de llover los charcos de agua formados eran utilizados por los perros callejeros para beber (Fig. 36).



Fig. 36. Barrio Las Américas. En A) B) y C) se observa el estado de las vías, los arroyos cerca a las viviendas, y los perros deambulando por el sector (la flecha indica el perro de la foto A detalladamente en la foto B, cerca al arroyo y al charco de agua).

Todas las casas donde se realizó captura se encontraban habitadas por familias (Total=8 casas), estaban construidas con techos de eternit ($8/8=100\%$), paredes de cemento ($7/8=87,5\%$) y una de las viviendas era de madera ($1/8=12,5\%$). Los pisos eran de tierra ($4/8=50\%$), cemento ($2/8=25\%$) o baldosas ($2/8=25\%$). En cuanto a los servicios públicos contaban con suministro de agua potable ($7/8=87,5\%$); para la eliminación de aguas servidas disponían de pozos sépticos ($5/8=62,5\%$), conexión a la red de alcantarillado ($2/8=25\%$) y letrinas ($1/8=12,5\%$) que en algunos casos se encontraban provistas de un tubo para verter su contenido en el arroyo canalizado que recorre el sector estudiado.

Lo que a basuras se refiere, los habitantes se las entregaban al carro recolector y pocos las arrojaban al arroyo mencionado, para que fueran arrastradas por la lluvia. Se destaca la labor de limpieza adelantado por algunas familias del

sector para evitar el acumulo de basuras, ya que sus niños jugaban al interior de este (Fig.37). Se observó la presencia de animales domésticos como gatos, gallinas, perros o morrocoyos al interior de las viviendas (88%:7/8) y entre las actividades económicas, cabe resaltar el empleo de caballos con carretas (carro mula) para transportar diversos productos; estos caballos convivían en los patios con los animales antes mencionados. Todas las familias encuestadas aseguraron ver ratones y ratas en los techos, habitaciones, cocinas, patios, los cuales se comían las gallinas y alimentos proporcionados a los caballos. Por esta razón tomaban como medida de prevención proteger los utensilios de cocina.

Llama la atención la vivienda donde habitó un hombre joven fallecido por padecer síndrome de Weil (DISTRISALUD, 2008) ubicada a orillas del arroyo descrito, la cual se caracterizó por tener todos los servicios públicos suspendidos al momento de aplicar la encuesta, poseer solamente una habitación donde se cocinaba y dormía a la vez. En el patio se ubicaba la letrina y era lugar de acopio para residuos sólidos empleados en la construcción (Fig.38).



Fig.37 Arroyo en el barrio Las Américas. En la foto se observa un niño descalzo quien atravesó el arroyo contaminado con aguas servidas de una vivienda.



Fig. 38 Vivienda del paciente fallecido por leptospirosis. Se observa la casa donde actualmente conviven los hermanos y la madre de la víctima. La flecha horizontal indica el tubo por donde caen al arroyo las aguas domiciliarias.

9.1.1.2 Descripción de las viviendas del barrio Por Fin

El barrio Por Fin se caracterizó por tener las vías de acceso a las viviendas estudiadas sin pavimento (Fig. 39), al caer la lluvia se formaban arroyos, pero no se encontraban canalizados en ese momento. Es un sector donde se ubican algunas caballerizas para resguardo y mantenimiento de caballos de exhibición (Total caballerizas=3). Estos locales también se incluyeron en el grupo de premisas para muestrear (Fig. 40).



Fig. 39 Barrio Por Fin. En la foto A y B muestra el estado de las calles.



Fig. 40. Caballeriza situada en una de las áreas de estudio. A) Al final de la calle se ubica la caballeriza El Enojos. Se observa la característica arenosa de la vía. En la foto B) y C) se aprecia el interior del establecimiento y el contacto directo de los trabajadores con los animales.

Los predios donde se atraparon los roedores (total 17) estaban contruidos con techos de eternit (15/17) y zinc (2/17), paredes de cemento (16/17= 94,1%) y madera (1/17= 5,9%); los pisos eran de cemento (12/17=70,6%) o tierra (5/17= 29,4%) (Fig. 41). El agua utilizada para consumo y labores domesticas era potable, y para disposición de aguas residuales se encontraban conectados a la red de alcantarillado (16/17=94,1%) o disponían de pozo séptico en el patio de la vivienda (Fig.15C). Las basuras generadas eran recogidas por la empresa de aseo distrital y animales como perros, gallinas, pollos y ardillas fueron las mascotas más observadas. A los habitantes de este sector les preocupaba el hecho que los ratones y las ratas cruzaban constantemente de una vivienda a la otra; además, se comían las gallinas y los alimentos almacenados para los caballos. Las personas tenían por costumbre, al igual que en los otros sectores, proteger los utensilios de cocina.



Fig. 41 Detalles de la viviendas trampeadas en Por Fin. En las fotos A y B se ilustra los materiales de construcción de las viviendas. En la foto B y C se observa la característica de la mayoría de patios, la falta de tapias permitía comunicarse con otras viviendas.

9.1.1.3 Descripción de las viviendas del barrio Rebolo

Este sector de estudio se caracterizó por contar con un acceso favorable a las viviendas, puesto que sus vías se encuentran pavimentadas (Fig. 42).



Fig. 42. Viviendas del barrio Rebolo. Nótese las vías con pavimento, andenes y bordillos. La mayoría de las viviendas tienen arquitectura similar, ya que es uno de los primeros barrios fundados en Barranquilla

Un gran arroyo canalizado recorre este sector de la ciudad denominado Arroyo de Rebolo y en el que desembocan los arroyos Hospital, La Paz y San Roque. (Figs.10C y 43) el cual permanece sucio, ya que se tiene por costumbre depositar las basuras para que sean arrastradas por la corriente que se forma durante la lluvia.

Las premisas donde se logró capturar los roedores eran de uso residencial (9/10=90%) y comercial (1/10=10%) utilizado como taller técnico mecánico. Todos los techos eran de eternit (10/10), las paredes de cemento (10/10) y los pisos de baldosa (4/10), cemento (5/10) y tierra (1/10). En lo que a servicios públicos se refiere todas las viviendas tenían suministro de agua potable, conexión a la red de alcantarillado, aseo y recolección de basura domiciliaria. Como animales domésticos tenían perros y gatos; estos últimos para que cazaran las ratas y los ratones que observaban frecuentemente al interior de sus viviendas (incluyendo los guardarropas o escaparates), trepando arboles, o desplazándose por los techos. Como medida de prevención de enfermedades protegían sus utensilios de cocina con tapa.



Fig. 43 Arroyo de Rebolo (ver Fig. 10C).

9.2 Capturas

9.2.1 Población de roedores

En 31 tardes de trampeo a partir del 12 de Mayo de 2009 hasta el 22 de Septiembre del mismo año, y utilizando 20 trampas para ratas y 10 para ratones en cada tarde de expedición, se obtuvo un tamaño muestral mayor ($n=69$) al que se encontraba estipulado en los cálculos estadísticos ($n=45$); de manera adicional se incluyó 1 individuo perteneciente a la especie *Didelphis marsupialis*, el cual fue hallado en predios de la Universidad del Norte (Tabla 7).

El mayor número de individuos fue capturado en el barrio Por Fin (37,7%) seguido de Rebolo (31,9%) y Las Américas (30,4%). El 71% (49/69) de los roedores capturados pertenecían a la especie *M. musculus*, el 23,2% (16/69) a la especie *R. rattus* y 5,8% (4/69) a *R. norvegicus*.

De acuerdo con el sexo el 59,4% (41/69) fueron hembras de las cuales el 22 % (9/41) se encontraban preñadas al momento de la captura y el 42% (29/69) restante eran roedores machos. El ejemplar de *D. marsupialis* analizado correspondió a una hembra (Tabla 7).

Los lugares de los predios donde se realizaron más capturas fueron: cocina, patios y en menor cantidad, dentro de los gabinetes de los guardarropas.

Tabla 7.

DETALLE DE LA CANTIDAD DE EJEMPARES CAPTURADOS DURANTE LA EXPEDICIÓN DE TRAMPEO					
BARRIOS	ESPECIE	CAPTURAS	MACHOS	HEMBRAS	HEMBRAS PREÑADAS
Las Américas	<i>M. musculus</i>	14	6	8	0
	<i>R. rattus</i>	5	1	4	1
	<i>R. norvegicus</i>	2	1	1	0
Por Fin	<i>M. musculus</i>	16	2	14	5
	<i>R. rattus</i>	9	6	3	1
	<i>R. norvegicus</i>	1	0	1	0
Rebolo	<i>M. musculus</i>	19	12	7	2
	<i>R. rattus</i>	2	1	1	0
	<i>R. norvegicus</i>	1	0	1	0
Universidad del Norte	<i>D. marsupialis</i>	1	0	1	0
Total		70	29	41	9

9.2.2 Población canina

Se estudió un total de 83 perros (*Canis familiaris*) a los cuales se les realizó examen clínico (83/83), extracción de muestras de sangre (83/83) y de orina (54/83). Todos los perros correspondieron a criollos adultos (83/83) y el 2,4% (2/83) fueron callejeros sin dueño, capturados en el barrio Por Fin y Las Américas, con ayuda de los vecinos quienes les proporcionaban los alimentos. Para obtener esta cantidad de ejemplares caninos (n=83) se realizó visita a las

áreas durante 8 días en horario matutino, a partir del 5 de Noviembre hasta el 3 de Diciembre de 2008.

El número más alto de perros fue capturado en el barrio Por Fin (36,1%) seguido del barrio Rebolo (32,5%) y finalmente en el barrio Las Américas (31,3%). De acuerdo con el género 32,5 % (27/83) correspondió a hembras y 67,5% (56/83) fueron machos (Tabla 8). Las hembras seleccionadas no mostraron evidencia de gravidez al momento de su valoración clínica.

Tabla 8.

NUMERO DE PERROS CAPTURADOS EN LAS AREAS DE ESTUDIO				
Barrio	Caninos seleccionados	Machos	Hembras	Hembras preñadas
Las Américas	26	19	7	0
Por Fin	30	20	10	0
Rebolo	27	17	10	0
Total	83	56	27	0

9.3 Cultivos de muestras biológicas

9.3.1 Cultivo de muestras de riñones

De las 70 muestras renales (69 roedores y 1 marsupial) maceradas con PBS 1X y cultivadas en los 3 medios de cultivo, el 8,6%(6/70) fueron sospechosas por presentar escasas bacterias con características morfológicas y de movimiento compatibles con *Leptospira* cuando se observó con microscopio de campo oscuro durante el seguimiento. De estas sospechas se obtuvo 1 (1/4) aislamiento de *Leptospira spp* en el medio de cultivo EMJH, a partir de una hembra de la especie *R. rattus* capturada en el barrio Rebolo el 21 de Agosto de 2009, observándose abundante crecimiento de bacterias luego de tres meses de incubación. Este aislamiento se mantuvo viable realizando subcultivos en EMJH y Fletcher cada 15/30 días y almacenando alícuotas en nitrógeno líquido.

El resto de subcultivos se revisaron microscópicamente hasta cumplirse 12 meses para las siembras del barrio Por Fin, 11 meses para las siembras de Rebolo y 8 meses para las correspondientes a las Américas.

El cultivo proveniente del ejemplar *R. rattus* capturado en Por fin el 2 de Junio de 2009, presentó escasas bacterias parecidas a *Leptospira* después de 10 meses de incubación (23 de Abril de 2010) y pese a que se realizó seguimiento

no fue posible aislarlo en los tubos de cultivo iniciales, ni en los subcultivos realizados cada 15/30 días.

Para corroborar que estas sospechas y el aislamiento eran leptospiras patógena se sometieron a ensayos de PCR en fases posteriores.

9.3.2 Cultivo de muestras de orina en perros

Un total de 54 sedimentos de orina diluidas en PBS 1X y cultivadas en los medios EMJH y Fletcher se revisaron bajo microscopio de campo oscuro durante un año (Noviembre de 2008 a Noviembre de 2009).

Se realizó subcultivo en los medios EMJH y Fletcher a 1,9 % (1/54) de cultivo sospechosos de aislamiento procedente del barrio Por Fin; este procedimiento se inició el 22 de Abril de 2009 y se le realizó seguimiento con subcultivos hasta que se cumplió un año (Abril de 2010), sin obtener crecimiento.

Al cabo de 12 meses cuando estos urocultivos (EMJH y Fletcher) fueron catalogados negativos se conservaron junto con alícuotas de 500 µl a partir del medio EMJH y se almacenaron en viales dentro de una criocaja (Nalgen) a temperatura ambiente para aplicar ensayos de biología molecular en una etapa posterior de la metodología.

9.4 Determinación de *Leptospira* patógena en las muestras animales y en el aislamiento mediante ensayos moleculares

9.4.1 Resultado en roedores

Por medio de la PCR, únicamente se logró detectar la presencia de leptospira patógena en los riñones de *R. rattus* en un 12,5% (2/16). El aislamiento del roedor *R. rattus* a partir del macerado renal, fue sometido a técnicas de PCR (Levett, 2005) para confirmar la patogenicidad de las espiroquetas y el resultado obtenido fue positivo (Fig.44). Además, una muestra de ADN extraída de macerado conservado a -80°C resultó positivo para el gen *lipL32* propio de *Leptospira* patógena.

Los dos individuos corresponden a hembras *R. rattus* y las capturas de estos roedores se realizaron en los barrios Rebolo y Por Fin respectivamente (Fig.45).

La concordancia entre la técnica de cultivo y la PCR para la detección directa de leptospiras fue considerada buena ($k= 0.6$)

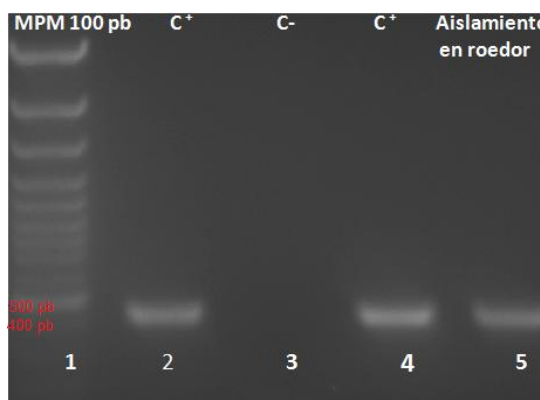


Fig. 44. PCR positiva correspondiente al aislamiento de *Leptospira* patógena (banda de 423pb) correspondiente al gen *lipL 32* conservado entre serogrupos patógenos de *Leptospira*. La fotografía muestra en 1) MPM de 100 pb. 2) y 4) C+ (Serogrupo Bataviae) 3) C- (serogrupo Patoc) 5) Aislamiento del roedor capturado en Rebolo.

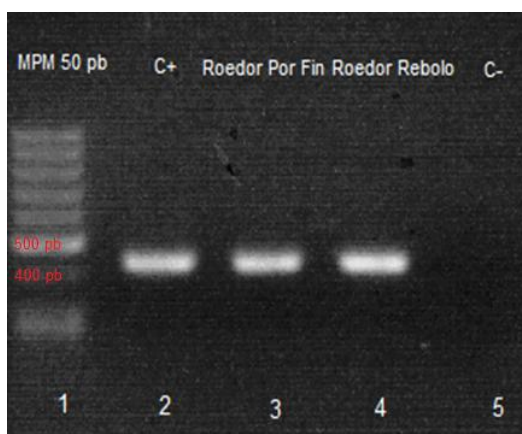


Fig. 45. Roedores positivos por ensayos de PCR. Los carriles contienen en 1) MPM de 50 pb. 2) C+ (serogrupo Bataviae) 3) Roedor barrio Por fin 4) Roedor barrio Rebolo 5) C- (serovar Patoc)

9.4.2 Resultados en caninos

Durante los doce meses que se examinaron los 54 urocultivos de perros, en ninguno de ellos fue posible aislar *Leptospira* (Noviembre de 2008 a Noviembre de 2009). Sin embargo, por métodos de biología molecular a 3,7% (2/54) de

los caninos investigados, se les determinó presencia de *Leptospira* patógena cuando se extrajo ADN a partir de los sedimentos urinarios almacenados a -80°C. (Fig. 46) Sin embargo, cuando se realizó protocolo de extracción de ADN, PCR y electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñida con Bromuro de Etidio a partir de los cultivos y subcultivos el resultado fue negativo.

De los dos caninos positivos por biología molecular, uno de ellos correspondió a un macho capturado en el barrio Por Fin, el cual mostró fiebre y espalda arqueada y no presentó anticuerpos contra *Leptospira* al momento de obtener las muestras; el otro canino fue una hembra incluida al estudio en el barrio Rebolo, con ligera ictericia cuando se hizo examen clínico y respuesta de anticuerpos contra serovar Icterohaemorrhagiae (1:800).

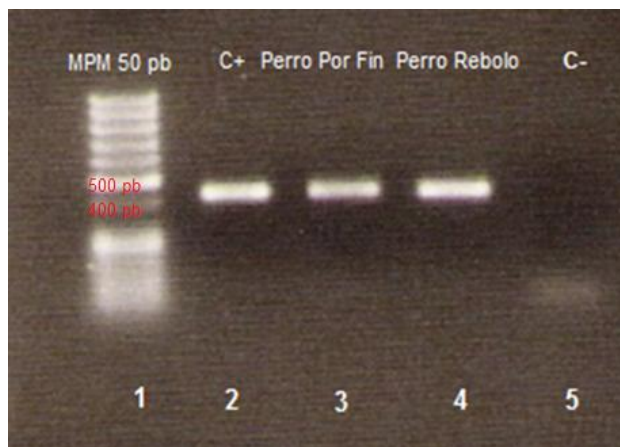


Fig. 46. Caninos positivos por ensayos de PCR. Los carriles contienen: 1) Marcador de peso molecular de 50 pb. 2) Control positivo (serovar Bataviae) 3) Producto de amplificación de un perro capturado en el barrio Por Fin. 4) Producto de amplificación de un perro capturado en el barrio Rebolo. 5) Control negativo.

9.5. Prueba de Microaglutinación MAT

9.5.1 Resultados de MAT en Roedores

El volumen de sangre total logrado en ratones y ratas correspondió a un promedio de 0.3 ml y 1 ml respectivamente, obteniéndose en algunos casos suero insuficiente para probar con todas los serovares patógenos. Sin embargo se contó con suero suficiente para realizar la primera prueba género específica o de tamizaje con el serovar Patoc, donde el 30.4 % (21/69) de los sueros resultaron positivos; la hembra de *D. marsupialis* también fue positiva en esta prueba (Fig.47).

Para la fase de MAT específica de serovar se utilizaron 21 serovares patógenos (Tabla 9), siguiendo el parámetro de positividad ($\geq 50\%$ de leptospiras aglutinadas y punto de corte en la dilución $\geq 1:40$), se determinó que el serogrupo responsable de la infección en cada individuo fue aquel en el que se observó el título más alto; es así que se obtuvo una seroprevalencia de 12,5%(IC 95% 0-28,7%), 20,4%(IC 95% 9,1-31,6%) y 25% (IC 95% 0-67%) para *R.rattus*, *M. musculus* y *R. norvegicus* respectivamente. Se presentó coaglutinación en 4 individuos de la especie *M. musculus* (Tabla 10).

La información completa de los diferentes títulos (1:5 hasta 1:160), en los que se observó aglutinación $\geq 50\%$ por individuo y por serovar se encuentran en el Anexo 6.

Tabla. 9 Panel utilizado en MAT serovar-específica de roedores

Panel utilizado en MAT de roedores			
Serogrupo	Serovar	Serogrupo	Serovar
Australis	Bratislava	Hebdomadis	Hebdomadis
Autumnalis	Bankinankg	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
Ballum	Ballum	Lousiana	Lousiana
Bataviae	Bataviae	Mini	Georgia
Canicola	Canicola	Panama	Panama
Celledoni	Anhoa	Pyrogenes	Robinsoni
Cynopteri	Cynopteri	Ranarum	Ranarum
D'jasiman	D'jasiman	Serjoe	Hardjo/Jin
Fainei	Hurstbridge	Sarmin	Sarmin
Grippytyphosa	Grippytyphosa	Tarassovi	Vughia

El serovar encontrado (prevalencia) en *R.norvegicus* fue Bratislava (1/4:25%), en *M. musculus*, Grippytyphosa (3/49: 6,1%), seguido por Canicola (1/49: 2%), Icterohaemorrhagiae (1/49: 2%) y Georgia (1/49: 2%). Co-aglutinaciones fueron observadas con Panama-Pyrogenes (1/49: 2%), Icterohaemorrhagiae-Bratislava (1/49: 2%), Icterohaemorrhagiae-Ballum (1/49: 2%) y Canicola-Serjoe

hardjo / jin (1/49: 2%). En *R. rattus*, se detectó Grippotyphosa (1/4: 25%) y Serjoe Jin (1/4:25%) (Tabla10). *D. marsupialis* no resultó positiva.

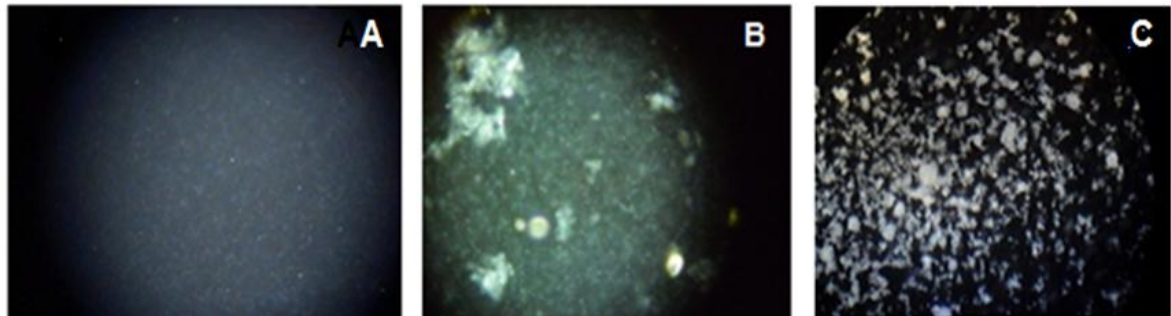


Fig.47. Determinación de resultados en MAT. A) Control Negativo B) Resultado negativo con $< 50\%$ de leptospiras aglutinadas. C) Resultado positivo con $\geq 50\%$ de leptospiras aglutinadas.

Tabla 10.

Prevalencias y serovares patógenas en roedores

Especie	Número capturado	MAT género específica título (1:5)	MAT serovar- específica (título $>1:40$)	IC	Título más alto	Serovar	Aglutinación cruzada	Título más alto
<i>Mus musculus</i>	49	16 (32,7%)	10 (20,4 %)	9,1%- 31,6%	1:40			1:40
					1:80	Canicola Grippotyphosa		1:80
					2 x (1:40)	Grippotyphosa	4 (40%)	1:40
					1:80	Icterohaemorrhagiae Georgia		1:40
<i>Rattus rattus</i>	16	4 (25%)	2 (12,5)	0 -28,7%	1:40			
					1:160	Grippotyphosa S. Jin	-	-
<i>Rattus norvegicus</i>	4	1 (25%)	1 (25%)	0 -67%	1:40	Bratislava	-	-
Total	69	21 (30,4%)	13 (18,8%)	9,2%-28%	-	-	-	-

9.5.1.1 Resultados de MAT en roedores por áreas de estudio

Los serovares más prevalentes en el Barrio Las Américas fueron Grippytyphosa y Panama-Pyrogenes en *M. musculus* y Serjoe jin en *R. rattus*, En el barrio Por Fin se halló prevalencia de Grippytyphosa mantenida en *M. musculus* y *R. rattus* e Icterohaemorrhagiae mantenida solo en *M. musculus*. Por último en el barrio Rebolo se encontró circulación de los serovares Bratislava, Canicola Georgia, Icterohaemorrhagiae, Serjoe hardjo / jin, Ballum mantenidas en *M. musculus* y Bratislava en *R. norvegicus* (Tabla 11 y Fig. 45)

Tabla 11

Distribución de serovares por especie de roedor en los barrios de estudio

Especies	Barrio								
	Las Américas			Por Fin			Rebolo		
	N° MAT serovar positiva	Serovar	Título más alto	N° MAT serovar positiva	Serovar	Título más alto	N° MAT serovar positiva	Serovar	Título más alto
<i>M. musculus</i>	3	Grippytyphosa Grippytyphosa Panama-Pyrogenes	1:80 1:40 1:40	2	Icterohaemorrhagiae Grippytyphosa	1:80 1:40	5	Canicola Georgia Ictero/Bratislava Ictero/Ballum Canicola/S.hardjo/S.jin	1:40 1:40 1:80 1:40 1:40
<i>R. rattus</i>	1	S. jin	1:40	1	Grippytyphosa	1:160	-	-	-
<i>R. norvegicus</i>	-	-	-	-	-	-	1	Bratislava	1:40

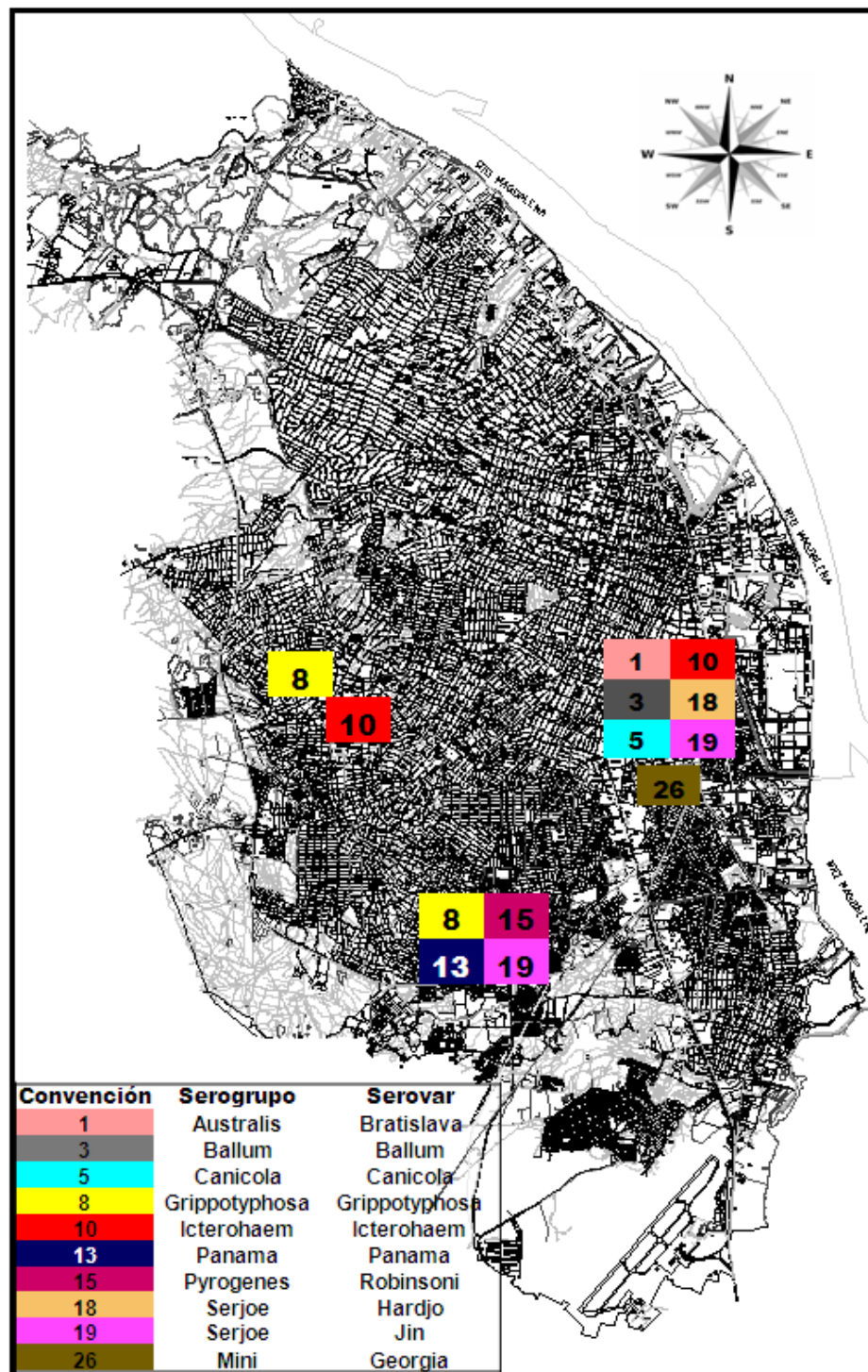


Fig. 48. Mapa de serovares patógenos en roedores

9.5.2 Resultado de MAT en caninos

El estudio de 83 sueros caninos realizando MAT específica de género, evidenció una seropositividad de 31,3% (26/83). Posteriormente cuando esos sueros positivos se sometieron a MAT con serovares patógenos (Tabla 6) y siguiendo el parámetro de positividad ($\geq 50\%$ de leptospiras aglutinadas y punto de corte en la dilución $\geq 1:100$), se obtuvo el 22,9% (19/83) de seroprevalencia de leptospiras patógenas (IC 95% 13,9-31,9%), (Fig. 46).

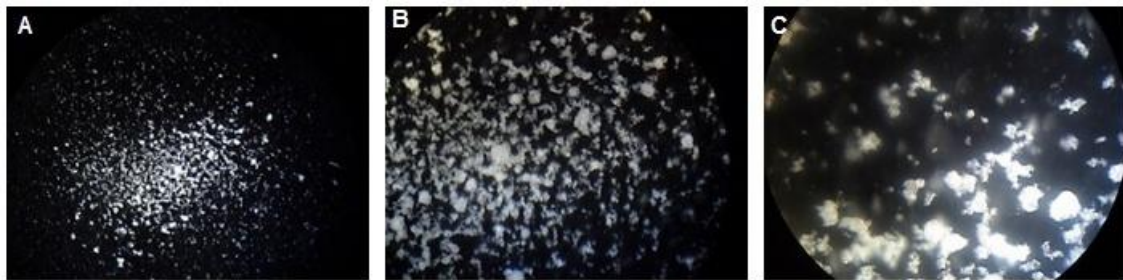


Fig. 49. Imagen de MAT positiva en un suero canino .Observado bajo microscopio de campo oscuro con objetivos de A) 10X B) 20X y C) 40X.

Los serovares patógenos (prevalencia) encontrados con mayor frecuencia fueron Icterohaemorrhagiae (4/83: 4,8% con títulos entre 1:100 hasta 1:800), al igual que Lousiana (4/83: 4,8% con títulos entre 1:400 hasta 1:25.600) y Vughia (4/83: 4,8% con títulos entre 1:100 hasta 1:800) seguidos por Hurstbridge (2/83: 2,4% con títulos entre 1:1.600 y 1:3.200), Bankinang (1/83: 1,2%, título 1:1.600) y Canicola (1,2% título 1:800). Patrones de conglutinación fueron observados en 1 perro del barrio Por Fin con los serogrupos Bankinang -

Hurstbridge y en 1 canino de Rebolo se presentó coaglutinación con Icterohemorrhagiae-Grippotyphosa-Sarmin (Tabla 12)).

Tabla 12

Distribución por barrios de serovares patógenos de *Leptospira* en la población canina

Barrio	N° Capturados	MAT género específica positiva título 1:25	MAT serovar específica $\geq 1:100$	Serovar	Título	Reacciones cruzadas	Título
Las Américas	26	7 (26,9%)	4 (15.4%)	Hurstbridge	1:1600*	-	-
				Vughia	1:100*	-	-
				Vughia	1:200*	-	-
				Vughia	1:800*	-	-
Por Fin	30	3 (10%)	3 (10%)	Bankinang	1:1600*	Bankinang/Hurstbridge	1:400
				Lousiana	1:400*		
Rebolo	27	16 (59.3%)	12 (44.4%)	Canicola	1:800	Grippotyphosa/ Icterohemorrhagiae/Sarmin	1:400*
				Hurstbridge	1:3200*		
				Grippotyphosa	1:800		
				Icterohemorrhagiae	1:100*		
				Icterohemorrhagiae	1:200*		
				Icterohemorrhagiae	1:400*		
				Icterohemorrhagiae	1:800*		
				Lousiana	1:800		
				Lousina	1:6400*		
				Lousiana	1:25000		
				Vughia	1:100*		
TOTAL	83	26 (31%)	19(23%) IC 95% : 13,9 - 31,9	-	-	-	-

*Perros que presentaron algún signo o síntoma de leptospirosis canina

Según el sexo el porcentaje de sueros positivos frente a MAT serovar-específica fue de 23,2% en machos y 22,2% en hembras.

9.5.2.1 Resultados de MAT en caninos por áreas de estudio

9.5.2.1.1. Resultados de MAT en caninos del barrio Las Américas

El comportamiento serológico en esta zona mostró el 15,4% (4/26) de perros positivos con MAT serovar específica y todos presentaron signos y síntomas de leptospirosis canina. Dos serovares patógenos aglutinaron las muestras de este sector de estudio, estas fueron: Hurstbridge (serogrupo Fainei) y Vughia (serogrupo Tarassovi). El serovar Vughia aglutinó el mayor número de sueros (3/4=75%), pero con Hurstbridge se presentó el título más alto donde se observó positividad (1:1600). Ver Tabla 12 y Fig. 47.

9.5.2.1.2 Resultados de MAT en caninos del barrio Por Fin

En el barrio Por fin el 10% (3/30) de los perros incluidos en el estudio fueron positivos al aplicar MAT específica de leptospirosis patógenas. Los serovares relacionados con los resultados fueron Bankinang y Lousiana (Tabla 12 y Fig 47). Estos perros positivos mostraron además, signos y síntomas de leptospirosis.

El serovar Bankinang aglutinó la mayoría de sueros (2/3=66,7%) y presentó el título más alto (1:1600), mientras que Lousiana aglutinó el 33,3% (1/3) de los sueros hasta la dilución 1:400. Se presentó coaglutinación con los serovares Bankinang- Hurstbridge en el 33,3% (1/3) de los perros, con título 1:400.

9.5.2.1.3 Resultados de MAT en caninos del barrio Rebolo

Rebolo presentó el 44,4% (12/27) de sueros caninos positivos con MAT serovar específica, constituyéndose en el área con mayor número de perros positivos y el número más alto de serovares circulantes (6) al compararlos con los otros dos barrios. Icterohaemorrhagiae fue el serovar (prevalencia) más frecuentemente aglutinado (4/27; 14,8%), seguido de Lousiana (3/27: 11,1%), Canicola, Hurstbridge, Grippotyphosa y Vughia cada con un perro infectado (1/27:3,7%). La Coaglutinación con tres serovares (Icterohaemorrhagiae-Grippotyphosa-Sarmin) fue observada en un perro. El 75% (9/12) de estos caninos positivos mostraron síntomas de leptospirosis, excepto el infectado con el serovar Canicola con un título de 1:800 y dos perros infectados con Lousiana, mostrando títulos de 1:800 y 1:25.600 cada uno. (Tabla 12 y Fig. 47).

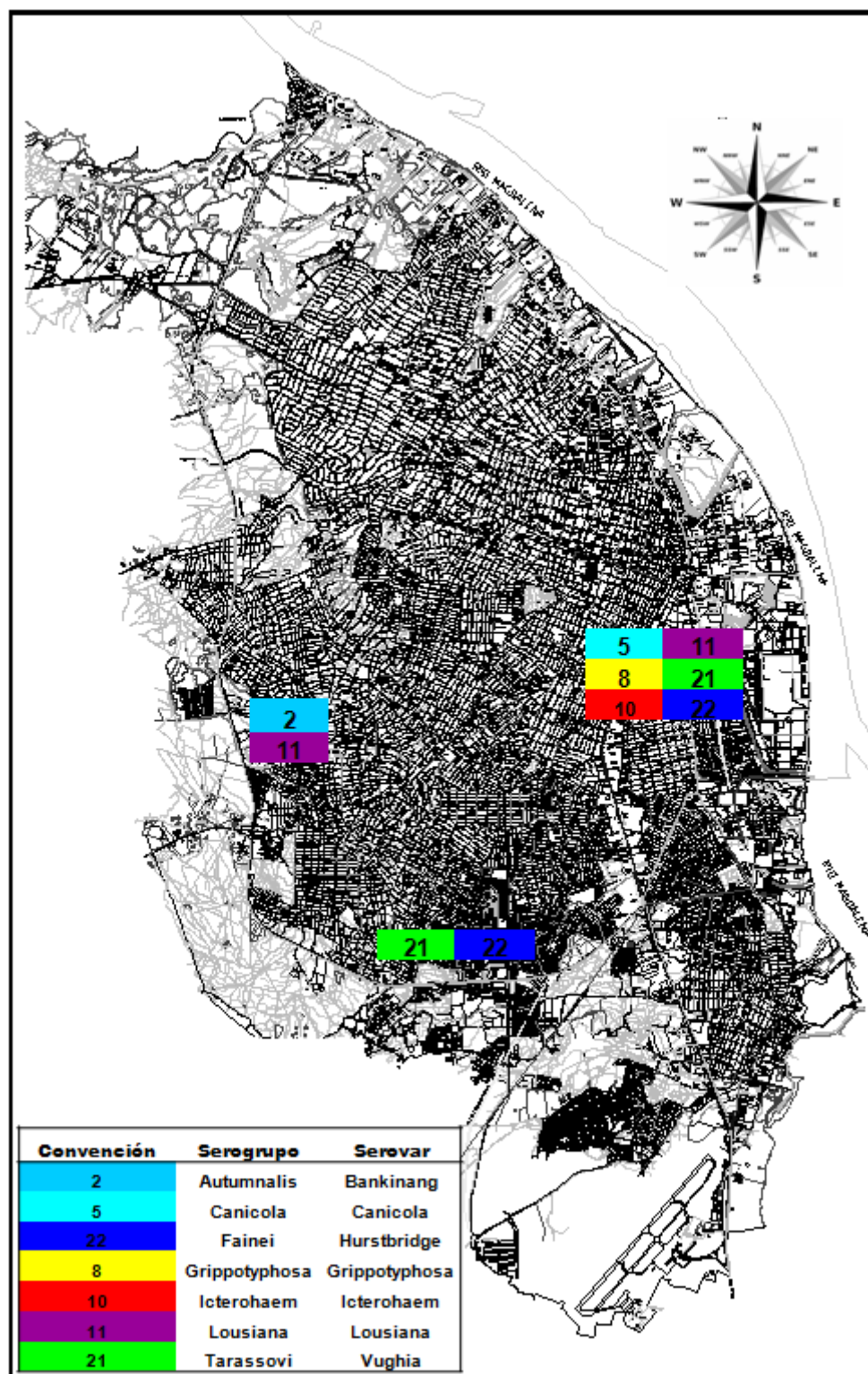


Fig. 50. Mapa de serovares patógenos circulando entre caninos.

9.6 Características clínicas encontradas en perros

El 78,9%(15/19) de los perros seropositivos presentó características clínicas descritas en leptospirosis canina (Faine, 1999) Estas fueron: espalda arqueada hallada en el 26,3% (5/19), vómito en un 15,8% (3/19), riñones inflamados y blandos en el 10,5%(2/19), depresión en 10,5%(2/19), fiebre en 26,3%(5/19), Ictericia y heces con sangre en el 5% (1/19) de estos. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en cada uno de estos síntomas con los resultados obtenidos en la prueba MAT (Tabla 13).

Tabla 13. Frecuencia de síntomas en caninos

Frecuencia de Síntomas en caninos				
Detalles clínicos	MAT serovar específica positiva n=19	Serovares	MAT serovar específica negativa n=64	Valor p Correccion de Yates
Espalda arqueada	26,3% (5/19)	Bankinang, Hurstbridge Vughia, Icterohaemorrhagiae	26,6% (17/64)	0.78366448
Movimiento reluctante	0		1,6% (1/64)	0.5162387
Orin con sangre	0		3,1% (2/64)	0.9427271
Vómito	15,8% (3/19)	Hurstbridge, Vughia, Lousiana	20,3% (13/64)	0.9142154
Riñones inflamados y blandos	10,5% (2/19)	Bankinang, Vughia	1,6% (1/64)	0.2549803
Depresión	10,5% (2/19)	Hurstbridge, Vughia	9,3 % (6/64)	0.7692839
Fiebre	26,3% (5/19)	Hurstbridge, Grippotyphosa Lousiana, Icterohaemorrhagiae Sarmin	34,4% (22/64)	0.7042303
Heces con sangre	5,3% (1/19)	Bankinang, Hurstbridge	7,8% (5/64)	0.8984446
Ictericia	5,3% (1/19)	Icterohaemorrhagiae	1,6% (1/64)	0.9427271

9.7 Contribución al conocimiento de la enfermedad

9.7.1 Habitantes de las aéreas estudiadas

De todos los integrantes de la comunidad que fueron citados a la charla educativa de leptospirosis, asistieron las madres comunitarias por su labor especial cuidando y educando niños en la primera infancia y los estudiantes de 9º, 10º y 11º del colegio del barrio las Américas, acompañados por sus profesoras de la asignatura biología.

Las madres comunitarias y docentes presentes en la reunión se comprometieron con difundir los nuevos conocimientos adquiridos, durante las reuniones de padres, en las clases de biología y cuando desarrollen actividades curriculares. En los otros barrios, las charlas fueron ofrecidas a las personas que acudían con sus perros y a los residentes de las viviendas donde se ubicaron las trampas para la captura de roedores.

9.7.2 Congresos, Simposios y Encuentros Investigativos

En el II encuentro de investigadores llevado a cabo en la Universidad del Norte, estudiantes de los programas de Educación, Enfermería, Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Medicina y profesores-investigadores que se acercaron al stand asignado al Grupo de Investigación en Enfermedades Tropicales, recibieron información acerca de la metodología llevada a cabo y los resultados

obtenidos en este proyecto. Los datos preliminares logrados a partir de muestras caninas de este estudio y presentados en el XIV Congreso Internacional de Medicina Tropical, se encuentran publicados en la revista Biomédica del mes de Octubre de 2009 (Anexo 10).

9.7.3 Autoridades de salud

Se entregó un informe parcial escrito a los jefes de los departamentos de Zoonosis, Oficina de Salud Pública y Enfermedades Transmitidas por Vectores de la Secretaría de Salud Pública de Barranquilla: Sr. Carlos de la Peña, Sra. Celia Cruz y Sr. Pedro Arango respectivamente. Además en una conversación personal sostenida con el Señor Carlos de la Peña para determinar la estrategia de prevención de esta zoonosis en la población canina de Barranquilla, se dio a conocer la forma de intervención que se realiza en las áreas para disminuir la infestación de ratas y ratones por medio de la entrega de productos rodenticidas.

10. DISCUSIÓN

A manera general, los barrios estudiados presentaron características ambientales que favorecen el mantenimiento *Leptospira* patógena, como son los suelos arenosos, la formación de charcos y barro durante la lluvia, la presencia de arroyos, las aguas negras al alcance de animales y personas; sumado al contacto humano intradomiciliario con animales domésticos principalmente perros y sinantrópicos como *M. musculus*, *R. rattus* y *R. norvegicus*. Se observó también la convivencia estrecha entre las personas y los caballos, constituyéndose estos últimos en posibles reservorios de la bacteria y fuente de infección para humanos y otros animales, por lo cual deben ser investigados en este contexto.

Aunque el barrio las Américas presentó todas las características ambientales (ver arriba) favorables para la circulación de *L. interrogans*, no se obtuvo aislamiento o detección de leptospirosis patógenas mediante PCR. Por el contrario, en los barrios Por Fin y Rebolo se lograron resultados positivos en perros y ratas al aplicar ensayos de biología molecular; se consiguió un aislamiento y viabilidad del mismo a partir de una captura de roedor procedente de Rebolo, el barrio con mayor número de serogrupos patógenos, tanto en roedores como en caninos. Este sector, si bien dispone de todos los servicios

públicos en las viviendas estudiadas, se encuentra recorrido por un arroyo grande (Arroyo de Rebolo) al que confluyen aguas de otros arroyos como: Hospital, La Paz y San Roque, este último atraviesa un sector de la ciudad próximo a la zona de comercialización de alimentos (mercado publico la Magola), por donde ingresa un alto porcentaje de productos comestibles a la ciudad (Alcaldía de Barranquilla, 2010), lo que atrae la presencia constante de roedores; además allí se venden animales para consumo humano, ya sea vivos (cerdos, carneros) o sus productos fraccionados (carne de res en canal, vísceras de res o porcinas) y también se observa la presencia de perros alrededor de estos puestos de ventas. Todo los desechos que se generan en este sitio, se mezcla con las aguas lluvias y residuales de otros barrios que son arrastrados por la corriente del arroyo. Otro punto importante que puede asociarse con los resultados obtenidos en este barrio es su ubicación contigua a la zona Franca de Barranquilla, sitio estratégico para el ingreso de animales y agentes infecciosos provenientes de otras regiones, incluyendo otros países, por el carácter de puerto internacional de la ciudad.

Por medio de aislamiento, una prevalencia del 6,25% de *L.interrogans* *sl* fue obtenida en *R.rattus*. No se logró aislamiento en las otras especies de roedores capturadas. En otros estudios, como el realizado en Madagascar en áreas urbanas y rurales, la única especie de roedor (incluyendo *R. norvegicus* y *M. musculus*), de la que fue posible obtener aislamiento fue *R.rattus*, con una

prevalencia del 10%, similar a la obtenida en nuestro estudio (Rahelinirina *et al.*, 2010); no obstante otros estudios realizados en áreas urbanas, han logrado aislar leptospiras patógenas de *R. norvegicus* (Agudelo *et al.*, 2009, Mathias *et al.*, 2008) y de *M. musculus* (da Silva *et al.*, 2010).

Pese a que en la población canina, se realizaron todas las flebotomías, no fue posible extraer orina en todos los ejemplares caninos (54/83=65%), ya que los animales orinaban espontáneamente antes de ser examinados, razón por la cual se optó por el uso del diurético inyectable Furosemida, para extraer las muestras mediante cistocentesis. La Furosemida parece ser muy adecuada para obtener muestras de orina de ganado cuando se pretende aislar *Leptospira*, ya que provoca una disminución de la osmolaridad, creando una condición más favorable para la supervivencia de las espiroquetas (Nervig RM, 1979). Sin embargo, en los caninos no se obtuvo aislamientos.

Entre las razones que pudieron contribuir con la no obtención de aislamientos, aún en aquellos individuos MAT positivos, a manera general (roedores y perros), se encuentran: a) estos animales no presentaban infección activa, por tanto los anticuerpos encontrados eran de infecciones pasadas (Songer *et al.*, 1983), b) poca existencia de leptospiras en las muestras de los individuos examinados c) el método usado para macerar riñones, en el caso de los roedores, debe mejorarse con el fin de obtener un mayor éxito en el cultivo y d)

en el caso de la población canina, pudo deberse a que inicialmente no se usó el fármaco 5'fluorouracilo en la preparación de los medios de cultivo, optando por filtrar la orina con un filtro de 0,22µm de porosidad después de ser diluida con PBS 1X, lo cual pudo reducir la posibilidad de que las leptospiras atravesaran el microporo o por la alta dilución de la muestra conteniendo pocas leptospiras; sin embargo, aunque a las muestras de Rebolo se les suprimió el paso de dilución y filtrado, usándose en su lugar el antimetabolito 5'FU, tampoco se obtuvo aislamiento de leptospiras en este barrio.

El uso de la técnica de PCR fue más sensible que el cultivo para detectar leptospiras patógenas en *R. rattus* y en perros; sin embargo no podemos concluir que el resto de individuos, aún los MAT negativos estuvieran libres de infección con leptospiras patógenas, ya que se ha reportado la limitación del uso de la PCR para detección del gen que codifica la proteína LipL32 en nuevas especies consideradas como patógenas intermedias, como es el caso de *Leptospira licerasiae* serovar Varillal en Perú (Matthias et al., 2008). Sin embargo, podemos decir que esta técnica se puede usar como método de diagnóstico directo y rápido para la detección de leptospira patógena en sangre y orina, ya que el aislamiento suele tomar mucho tiempo para obtener un resultado y, puede contaminarse fácilmente disminuyendo esta posibilidad. Esta rapidez de detección se acompaña de una alta especificidad y sensibilidad (Levett and Edwards, 2009).

No obstante, para el entendimiento de la epidemiología de la leptospirosis en la ciudad es necesario lograr aislamientos y continuar estudios de caracterización a partir de los productos de PCR hasta el nivel de serovar, mediante técnicas moleculares como el Pulse Field Gel Electroforesis que puede ser aplicado en los casos de aislamiento o por la Multi Locus Sequence Typing, esta última con varias restricciones (Galloway & Levett, 2010).

Aunque no se obtuvo aislamiento de leptospiras en la población canina, en dos perros se detectó la presencia de leptospiras patógenas mediante el uso de la técnica de PCR para una prevalencia del 2,4%. Uno de estos perros, fue capturado en el barrio Por Fin, este presentó fiebre, espalda arqueada, bajo peso y MAT negativo, se observó un cultivo sospechoso, pero finalmente no se obtuvo el aislamiento; esto nos confirma el rol de reservorio de este perro, haciéndose necesario realizar futuros estudios moleculares, tales como el Multi Locus Sequence Typing para determinar el serovar presente en su organismo. En el perro de Rebolo que presentó seropositividad contra serogrupo *Icterohaemorrhagiae* (1:800), fue negativo con el urocultivo, aunque no se diluyó la muestra al momento de sembrar; No obstante, mediante PCR se demostró la presencia de la bacteria patógena, la cual deberá ser estudiada en etapas posteriores, para determinar la serovariedad a la cual pertenece. Debido a que este perro mostró signos como ictericia, existe la posibilidad de ser provocado por el serogrupo *Icterohaemorrhagiae* (Luna et al, 2008). Se

reitera la importancia de la circulación de este serogrupo patógeno en esta área de Barranquilla.

Si bien, el número de *R.norvegicus* colectados fue reducido (n= 4), la seroprevalencia de leptospirosis patógenas fue la mayor (25%) muy similar a la prevalencia encontrada en esta especie en un sector urbano de la ciudad de Medellín (21%), con una población de roedores de esta especie, considerablemente mayor (n = 254) (Agudelo *et al.*, 2009). Por medio de ensayos de MAT se determinó la infección de esta especie con el serogrupo Bratislava, poco común en roedores pero habitual en caballos, pudiéndose deducir el rol que posiblemente cumplen los equinos en la transmisión de leptospirosis en las áreas de estudio, probablemente mediante la contaminación de los arroyos con orina infectada y la subsecuente contaminación de *R. norvegicus* cuyos hábitos acuáticos son característicos.

M. musculus fue la especie de roedor en la cual se capturó mayor número de individuos (49/79) y se obtuvo una seroprevalencia del 20,4%. El éxito de la captura se debió, probablemente a la eficacia de la trampa (comercial), en comparación con las otras dos especies en donde se usaron trampas diseñadas artesanalmente; sin embargo, en un estudio realizado por Vanasco en área urbana de Santa Fe, Argentina (Vanasco *et al.*, 2003), también se capturó un alto número de ejemplares, perteneciente a esta especie y se obtuvo así mismo una seroprevalencia alta (34%), en comparación con *R.rattus* y *R.norvegicus*.

El serogrupo Grippotyphosa fue más prevalente en esta especie que en las otras estudiadas, incluyendo los caninos, determinándose su papel en la transmisión de este serogrupo de *Leptospira* a humanos, como se evidencia en los datos de serogrupos infectando humanos detectados en la ciudad de Barranquilla (Romero-Vivas et al., 2009 y Secretaria Distrital de Salud); sin embargo, no hay que descartar el papel que marsupiales pudieran tener en la transmisión de este serogrupo patógeno, ya que estos animales habitan la ciudad, especialmente la especie *Didelphis marsupialis*, si bien en el espécimen de esta especie, colectado en nuestro estudio resultó negativo para MAT, aislamiento y PCR.

La infección por serogrupo Ballum, típica en *M.musculus* (Barthi, 2003, Levett and Edwards, 2009, da Silva et al., 2010), fue detectada en una reacción de coaglutinación, sin embargo no se podría confirmar su presencia ya que no se obtuvo aislamiento o resultados positivos por PCR en las muestras obtenidas de ratón. El serogrupo Icterohaemorrhagiae fue diagnosticado en esta especie al igual que Canicola, evidenciando la relación estrecha entre ratas, ratones y perros. Las coaglutinaciones en *M. musculus* con los serogrupos: Panama-Pyrogenes, Icterohaemorrhagiae-Bratislava; Ballum-Icterohaemorrhagiae; Canicola-S.jin, pudieron deberse a reacciones del suero contra determinantes antigénicos, compartidos por los serogrupos o a infección con más de un serovar de *L.interrogans* sl. Para discriminar la razón se debería confirmar por

ensayos moleculares, pero en esta especie de roedor no fue posible obtener productos de PCR ni aislamientos.

La seroprevalencia observada en la especie *R. rattus* del 12,5%, fue la menor encontrada entre las especies de ratas analizadas, así como lo han reportado otros estudios; por ejemplo, en áreas de alta endemicidad en Tailandia en donde se encontró una seroprevalencia del 4,7%, menor igualmente que la seroprevalencia encontrada en *R. norvegicus* (7,9) (Kositanont U et al., 2003) y en Israel (Lindenbaum I et al., 1982) en donde se encontró una seroprevalencia del 8,1% en *R. rattus* (poco menor que en *R. norvegicus*: 9,9%). Serológicamente fue diagnosticado el serovar Grippotyphosa en *R. rattus* (así como en ratones), evidenciando igualmente el papel de esta especie de roedor en la transmisión de este serogrupo a humanos (Macías *et al.*, 2005; Romero-Vivas *et al.*, 2009; Secretaria Distrital de Salud, 2010, información provista por Pedro Arango Padilla). Si bien, el serovar Serjoe jin , encontrado en *R. rattus* del Barrio Las Américas, se ha registrado en reservorios tales como vacas y carneros (Bondarenko AL, 2002; Seawright D.1992; Barton MD.1994); sin embargo en las visitas realizadas a este barrio, no se observó la presencia de estos animales.

Ningún roedor de las especies *R. rattus* y *R. norvegicus* fue positivo contra serovar Icterohaemorrhagiae. Con este resultado se confirma el carácter de portadores renales de esta especie de roedores, especialmente para este serogrupo patógeno, bien adaptado a este huésped, no causándole

enfermedad ni respuesta inmunológica. Después se conocerá por ensayos de biología molecular, el serovar al cual pertenece el aislamiento obtenido de esta especie de roedor.

Se encontró seroprevalencia relativamente alta en caninos (22,9%) y un alto número de serogrupos diagnosticados, ya que esta especie animal no solamente juega un papel de huésped de mantenimiento sino de huésped accidental, permitiendo así detectar anticuerpos específicos de serovar. Si bien en su mayoría tenían dueños (97,6%), se observó que salían fácilmente a la calle y podían estar en contacto con arroyos y otros perros; además las altas infestaciones de roedores en estos barrios, favorece el contacto entre estas especies de animales mediante la contaminación de agua y alimento de perros con orina de roedores y el hábito de cazadores de ratas, reportados por sus dueños.

Los serovares patógenos más prevalentes en estos perros fueron: *Icterohaemorrhagiae*, *Vughia* (serogrupo *Tarassovi*) y *Lousiana*, seguidos de *Hurstbridge* (serogrupo *Fainei*) , *Bankinang* (serogrupo *Autumnalis*) y *Canicola*. Si bien se capturaron un número similar de perros (al igual que en roedores) en cada barrio, fue en Rebolo donde se encontró el mayor número de serovares (6).

Seroprevalencias similares se han encontrado en poblaciones caninas en Colombia; por ejemplo en Montería se reportó el 27,3%, siendo las más prevalentes *Canicola*, *Autumnalis*, *Bataviae*, *Pomona* e *Icterohaemorrhagiae*

(Navarrete, 1981); Tolima (Romero & Sánchez, 2009) con el 20,2%, siendo los serovares prevalentes *Grippytyphosa* e *Icterohaemorrhagiae*. Para estudiar estos perros también se contó con el consentimiento de sus dueños, lo que nos sugiere que no eran exclusivamente callejeros. En Manizales durante un estudio de seroprevalencia de leptospirosis canina (Silva *et al*, 2008), encontraron el 20,5% de positividad, siendo frecuentes *Canicola*, *Grippytyphosa* e *Icterohaemorrhagiae*. Sin embargo, alta seroprevalencia se halló en perros callejeros de Cali con un 41% (Rodríguez-Santafé, 2004), en esta ocasión el serovar más prevalente fue *Icterohaemorrhagiae*.

Estudios realizado en otros países no tropicales como Estados Unidos (Gautam *et al*, 2010) reportan una seroprevalencia del 8,1% (n=33.119) en sueros caninos sometidos a laboratorio diagnóstico comercial, entre los años 2000-2007 con las serovariedades *Autumnalis*, *Grippytyphosa*, *Bratislava* y *Pomona* ; el serovar *Grippytyphosa* fue encontrado con altas prevalencia en perros europeos (Geisen 2007, Alemania) y como causante de falla renal en caninos de E.U.A (Brown, 2007).

En nuestro estudio se destaca el empleo de un panel de 24 serovares patógenas de *Leptospira* y mayores diluciones seriadas del suero (1:25 hasta 1:25.600) para la realización de MAT, en tanto que en las investigaciones anteriormente citadas usaron paneles ≤ 11 serovariedades patógenas, lo cual limita de alguna forma la información de exposición canina a otras serovariedades.

Es así que nuestros resultados muestran frecuencias de aglutinación con serovares poco descritos en perros como lo son Vughia (serogrupo Tarassovi), Lousiana (serogrupo Lousiana) y Hurstbridge (serogrupo Fainei) cuyos reservorios para Tarassovi y Fainei son los cerdos (Perolat *et al*, 1998; Barthi, 2003). En cuanto al serovar Lousiana nos fue difícil encontrar su reservorio natural en la literatura, sin se observó el título más alto, sin la presencia de signos y síntomas en el perro positivo, proveniente del barrio Rebolo; pese a estos resultados extremadamente altos, indicativos de infección reciente, el perro estuvo aparentemente sano. Este fenómeno puede ocurrir en los estados posteriores a una infección aguda, donde los títulos pueden tomar meses, o incluso, años en caer a niveles bajos (Levett and Edwards, 2009). Contrario a los estudios mencionados, los serovares Canicola, Bankinang (serogrupo Autumnalis) y Grippytyphosa reportaron bajas prevalencias, si bien los títulos detectados fueron altos en Bankinang (1:1600), Canicola (1:800) y Grippytyphosa (1:800).

Se obtuvo resultados con títulos altos en las reacciones cruzadas de 2 ejemplares caninos capturados en los barrios Por Fin (Bankinang- Hurstbridge: 1:400); y Rebolo (Grippytyphosa-Icterohaemorrhagiae-Sarmin: 1400), ambos presentaron signos clínicos, como espalda arqueada acompañada de heces sanguinolentas y fiebre respectivamente. En pacientes con infección en curso o reciente, la reacción cruzada en la MAT puede hacer imposible la identificación del serovar infectante o de su serogrupo con algún grado de certeza. Puede ser

útil obtener una muestra de suero algún tiempo después de aparición de la enfermedad (1 mes) con la esperanza de que, para ese tiempo, los anticuerpos residuales sean lo suficientemente específicos como para dar una indicación del serogrupo (OPS, 2008). Pero no se realizó toma de segunda muestra estos perros.

Es importante resaltar que las reacciones de los sueros caninos contra los 24 serovares patógenos, especialmente contra *Icterohaemorrhagiae* y *Canicola*, no se debieron a la presencia de anticuerpos generados como consecuencia de inmunizaciones previas contra *Leptospira*, ya que al momento de tomar las muestras, ningún individuo incluido se encontraba vacunado. La razón obedece a que en el distrito de Barranquilla aún no se dispone de un programa implementado por la Secretaría de Salud que aborde este tipo de campañas, y la prevención se hace interviniendo la infestación de roedores en los diferentes barrios de la ciudad (comunicación personal, Dr. Peña. MV; Secretaría de Salud Distrital). Por lo tanto, las vacunas contra *Leptospira* deben ser adquiridas comercialmente en clínicas veterinarias de la ciudad de Barranquilla, las cuales disponen de aquellas que protegen contra las serovariedades *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* simultáneamente, pero ninguno de los dueños reportó la vacunación de sus perros para protegerlos de esta enfermedad.

Teniendo el conocimiento de las serovariedades circulantes en Barranquilla se aporta una valiosa información que permite a futuro adquirir las vacunas que

protejan ampliamente esta población animal y se minimice de esta forma la transmisión urbana de leptospirosis humana

Son pocos los estudios de *Leptospira* adelantados en Colombia y otros países donde se ha investigado simultáneamente y dentro de una misma área geográfica, a perros y roedores que incluyan a la especie *M. musculus*. Nuestra investigación demostró una seroprevalencia mayor a la reportada por el estudio preliminar de leptospirosis en roedores y canes del Perú (Sacsquispe, 1999), donde el 16,6% (2/12) de las ratas capturadas fueron positivas frente a serovar Grippotyphosa sin obtener aislamientos y en los caninos solo 1 de los 3 (33%) perros incluidos reaccionó frente a serogrupo Canicola. En Jalisco (México) el 6,2% (22/354) de las ratas de las especies *R. rattus*, *R. norvegicus* y el 22,67% de los perros (95/419) fueron positivos cuando se utilizó un panel de 13 serovariedades de *Leptospira spp.* (datos de serogrupos no mostrados).

En nuestro estudio al comparar los signos y síntomas compatibles con leptospirosis entre el grupo de perros MAT positivos y MAT negativos, no se evidenció una asociación estadísticamente significativa ($p \geq 0.05$). Estos signos y síntomas pueden deberse a manifestaciones de otros cuadros clínicos que se dan en estos animales y cursan con fiebre, vómito, heces con sangre, tal como la Parvovirus canina, Ehrlichiosis, Babesiosis, etc (Miranda, 2008; McDonough, 2003).

La especie *D. marsupialis* fue positiva en la prueba de tamizaje, pero no al enfrentarla con los serovares patógenos, probablemente se requiera de otros serovares que no se encuentran incluidos en el panel de referencia. Estos resultados coinciden con de Faria, 2008, quien reportó en un estudio realizado en Brasil, que en los *Didelphis marsupialis* (opossum, n=8), capturados e incluidos en un estudio con roedores, no se obtuvo aislamientos renales, y 5 de ellos fueron positivos con MAT utilizando serogrupo saprofítico.

Los resultados obtenidos en este estudio, se han dado a conocer a las autoridades de salud competentes de la ciudad resaltando al barrio Rebolo como un área prioritaria ya que por su proximidad a una zona de embarque y desembarque de productos, contribuye con la distribución del agente causal de leptospirosis a diferentes puntos geográficos, no solo a nivel nacional, sino extranjero.

12.CONCLUSIONES

Los barrios Las Américas, Por fin y Rebolo presentaron factores ambientales favorables para el mantenimiento de *Leptospira* tales como: condiciones de humedad representadas en canales de aguas desbordados, aguas negras y convivencia estrecha con animales sinantropicos y domésticos. Además, de la importancia que cobra la cercanía de Rebolo a la zona franca y al Mercado Público de la ciudad.

De las dos especies de animales investigadas se obtuvo aislamiento de *Leptospira spp* a partir de *R. rattus* y el marcador de patogenicidad *lipL32* permitió confirmar que se trataba de una especie patógena.

Se detectó por PCR la presencia de leptospira patógena en *R.rattus* en un 12,5% y en perros en un 3,7%.

Nuestro estudio evidenció seropositividad frente a serovares patógenos del género *Leptospira* en roedores, con una prevalencia del 18,8% en general y del 25%, 20,4% y 12,5% en *R. norvegicus*, *M. musculus* y *R. rattus*, siendo los serovares más prevalentes Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae, seguidos de Canicola, S. jin y Bratislava.

En caninos se obtuvo una seroprevalencia del 22,9%, siendo los serovares Icterohaemorrhagiae, Lousiana, Vughia y Hurstbridge los más frecuentes seguidos de Canicola y Grippotyphosa.

Las características clínicas asociadas a leptospirosis canina observadas en los perros estudiados, no guardan una asociación estadísticamente significativa, sugiriendo el rol de reservorio de esta especie animal, en el área de estudio.

La importancia epidemiológica de los perros en la transmisión de la leptospirosis a humanos, se evidenció en que el serovar Vughia (serogrupo Tarassovi, altamente prevalente en esta especie, fue diagnosticado con un título alto en el suero único de paciente fallecido por esta enfermedad (Romero-Vivas, 2009).

Las charlas educativas permitieron sensibilizar las comunidades y otros estamentos acerca de aspectos propios de la enfermedad y concientizarlos acerca de la importancia que otros animales diferentes a los roedores, tales como perros, caballos, cerdos, marsupiales y vacas poseen como reservorios de serogrupos patógenos de *Leptospira*, los cuales conviven con humanos en barrios de alta incidencia de la enfermedad en Barranquilla.

RECOMENDACIONES

Caracterizarlos molecularmente hasta el nivel de serovar y/o especie el aislamiento obtenido y realizar mayores intentos de aislamientos en perros y roedores de la ciudad, para adicionarlos al panel de cepas utilizadas en el diagnóstico regional y nacional.

Caracterizar molecularmente (secuenciación y estudios filogenéticos) hasta nivel de especie, los productos de PCR obtenidos en roedores y caninos.

Aplicar otras técnicas moleculares para la detección del género *Leptospira* en todas las muestras obtenidas y posterior caracterización a nivel molecular, para detectar la presencia de especies intermedias que puedan estar presentes en estos hospederos.

Proponer al programa de inmunización contra leptospirosis canina en Barranquilla, la inclusión de otros serovares como Lousiana, Vughia, Hurstbridge y Grippotyphosa además de los serovares Canicola e Icterohaemorrhagiae.

Suministrar tratamiento antibiótico a los perros que resultaron positivos mediante los ensayos de PCR y MAT.

Extender este estudio a otras poblaciones animales como caballos, cerdos, marsupiales y vacas, ya que se concluye su importancia como fuentes de infección para roedores y caninos; aumentando el riesgo en humanos por su

convivencia al interior de las residencias, ubicadas en barrios de alta incidencia de la enfermedad.

Establecer programas educativos de difusión masiva, para que se adopten medidas de higiene ambiental y protección personal durante el contacto con los animales domésticos y sinantrópicos en esta ciudad.

Concientizar a la ciudadanía acerca de la importancia de mantener los arroyos de Barranquilla libres de basuras y evitar al máximo que las personas se sumerjan en ellos sin protección.

BIBLIOGRAFIA

Agudelo-Flórez P, Londoño AF, Quiroz VH, Ángel JC, Moreno N, Loaiza ET, et al. Prevalence of *Leptospira* spp in Urban Rodents from a Groceries Trade Center of Medellín, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2009; 81(5): 906–910.

Agudelo-Flórez P. Leptospirosis humana en Colombia: la experiencia del Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Universidad CES. CES Med. 2007; 21(1): 55-58.

Agudelo-Flórez P, Restrepo BN, Céspedes M, Vinetz J. Leptospirosis en Colombia: estudio seroepidemiológico en la comunidad indígena Embera-Katío. CES Med 2007;(21): 111.

Barringer I. *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo bovis: the agent, effects on pregnancy and diagnosis. Pfizer Animal Health. Technical bulletin. 2002. PP: 1- 4.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al Peru-United States Leptospirosis Consortium. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. 2003; 3: 757–71.

Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermethorn T, Randolph JF, Simpson KW. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. J Small Anim Pract. 1998; 39(5): 231-6.

Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. Semin Vet Med Surg (Small Animal).1996; 11(3):166-71.

Bondarenko AL, Utenkova EO, Russkikh GA, Khmelevskaia NS. Epidemiology of leptospirosis in the Kirov region. Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol. 2002; (3): 27-30.

Bonilla-Santiago R, Nally JE. Rat model of chronic leptospirosis. Curr Protoc Microbiol. 2011; (12E):13.

Borg-Petersen C, Fagraeus A. The influence of the antigen density and other factors on the serum titer in the agglutination-lysis-test for leptospirosis. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1949; 26 (4): 555-67.

Brown CA. *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa infection in dogs. *J Small Anim Pract.* 2007; 48 (6): 324 – 328.

Bunnell JH, Hice CL, Watts DM, Montrueil V, Tesh RB, Vinetz JM.. Detection of pathogenic *Leptospira* spp infection among mammals captured in the Peruvian Amazon Basin Region. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63 (5): 255–258.

Cachay ER, Vinetz JM. A global research agenda for leptospirosis. *J Postgrad Med.* 2005; 51(3):174-8.

Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe-CIOH. Climatología Puertos del Caribe Colombiano: Barranquilla. Fecha de Consulta: Diciembre 12 2009. Disponible en <http://www.cioh.org.co/index.php/climatologia-en-puertos-del-caribe>.

Da Silva EF, Félix SR, Cerqueira GM, Fagundes MQ, Neto AC, Grassmann AA et al. Preliminary Characterization of *Mus musculus*-derived pathogenic strains of *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum in a Hamster model. *American Am J Trop Med Hyg Journal.* 2010; 83 (2): 336-7.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Censo general año 2005. Fecha de consulta 12 de Diciembre de 2009. Disponible en: http://www.dane.gov.co/daneweb_V09/#twoj_fragment1-3.

De Faria M, Calderwood M, Athanazio DA, McBride JA, Hartskeer RA, Pereira MM, et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop* 2008; 108:1–5.

Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN. Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerg Infect Dis.* 1997; 3 (1): 78-80.

Ellis GR, Partington DL, Hindmarsh M, Barton MD. Seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in merino stud rams in South Australia. Aust Vet J.1994; 71 (7): 203-6.

Eptein PR, Calix Pena O, Blanco Racedo J. Climate and disease in Colombia. Lancet.1995; 11; 346(8985): 1243-4.

Faber NA, Crawford M, Lefebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, Willits NH. Detection of *Leptospira* spp in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. J Clin Microbiol. 2000; 38 (7): 2731-3.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, MediSci, 1999:1-272.

Farr RW. Leptospirosis. Clin Infect Dis. 1995;21(1):1-6

Ferro BE, Rodríguez AL, Pérez M, Travi BL. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en Cali. Biomédica. 2006; 26:250-7.

Galloway RL, Levett PN. Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. Plos Negl Trop Dis. 2010; 4 (9): 824.

Gautam R, Wu CC, Guptill LF, Potter A, Moore GE. Detection of antibodies against *Leptospira* serovars via microscopic agglutination tests in dogs in the United States, 2000-2007. J Am Vet Med Assoc. 2010; 237 (3): 293-298.

Geisen V. Canine leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups 42 cases. J Small Animal Pract. 2007; 48 (6): 324 – 328.

Geneviève André-Fontaine. Canine leptospirosis. Do we have a problem? Vet Microbiol. 2006; 117:19–24.

Giraldo-de León. Los roedores como reservorios de *Leptospiras* en planteles porcinos de la zona central cafetera de Colombia. Arch Med Vet. 2002 34 (1).69-78.

González A, Velandia MP, Acosta J. Situación actual de las enfermedades transmisibles en Colombia y propuesta organizativa. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2000; (16): 248-48.

Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira spp.* *J Bacteriol.* 1993; (13): 4225-34.

Hauk P, Macedo F, Romero C, Vasconcellos S, Hauk P, Macedo F. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C Terminus Is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Brazil Infect Immun.* 2008; 76 (6): 2642–2650.

Higa HH, Fujinaka IT. Prevalence of rodent and mongoose leptospirosis on the island of Oahu. *Public Health Rep.* 1976; 91 (2) :171-7.

Hoke D, Suhelen E, Cullen P A, Adler B. LipL32 Is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira spp* and *Pseudoalteromonas tunicate*, Australia. *Infect Immun.* 2008; Vol 76 (5): 2063–2069.

Iwamoto E, Wada Y, Fujisaki Y, Umeki S, Miyuki Y, Mizuno T et al. Nationwide survey of *Leptospira* antibodies in dogs in Japan: Results from microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Med.* 2009; 71(9): 1191–1199.

Klaasen HL, Molkenboer MJ, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet Microbiol.* 2003; 95 (1-2)121–132.

Ko AI, Galvao RM, Ribeiro DC, Johnson WD Jr, Riley LW. Leptospirosis Study Group. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *The Lancet.* 1999; 354: 820-5.

Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009 (10):736- 747.

Koehn D. A survey of rat populations at Springfield Plantation. Texas A&M University study abroad summer. Dominica, W.I pp 1-8. 2003.

Kositanont U, Naigowit P, Imvithaya A, Singchai C, Puthavathana P. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in rodents and shrews trapped in low and high endemic areas in Thailand. J Med Assoc Thai. 2003; 86 (2):136-42.

Kshirsagar PP, Sonavane AD, Doshi AC, Teltumbde U, Mandalik S. Atypical presentation of leptospirosis. J Assoc Physicians India. 2010; 58:117-8.

Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Lai. South Korea. Gene. 2000; 254(1-2):19-28.

Levett P & Edwards C. Leptospirosis. Evan's Bacterial Infections of Humans. 4th ed. 2009. Chapter 21. pp : 1-23.

Levett PN. Sequence-based typing of *Leptospira*: epidemiology in the genomic era. PLoS Negl Trop Dis. 2007; Vol 1: 1-2.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56: 671–673.

Levett PN. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol. 2005; 54: 45–49.

Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001;14: 296-326.

Lindenbaum I, Eylan E. Leptospirosis in *R. norvegicus* and *R. rattus* in Israel. Isr J Med Sci. 1982;18(2): 271-5.

Little TW, Hathaway SC, Boughton ES, Seawright D. Development of a control strategy for *Leptospira hardjo* infection in a closed beef herd. Vet Rec 1992; 24; 131(17):383-6.

Luna AMA, Moles CLP, Gavaldón RD, Nava VC, Salazar GF. La leptospirosis canina y su problemática en México. Rev Salud Animal. 2008; 30 (1):1-11.

McDonough. PL. Leptospirosis en caninos - Estado actual. Traducido por: J. N. Borman Maiztegui Department of Population Medicine and Diagnostic Science, Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Cornell. University, Ithaca, New York, USA. 2003., Córdoba, Argentina pp: 6.

Macías-Herrera JC, Vergara C, Romero-Vivas C, Falconar A. Comportamiento de la leptospirosis en el departamento del Atlántico (Colombia) enero de 1999 a marzo del 2004. Salud UNINORTE. 2005;20:18-29.

Marder G. Leptospirosis en roedores. Rev Vet. 2008. 19(2):150–153.

Martínez RG. Estado actual de la leptospirosis. ICA-CEISA. MVZ- Córdoba 2000; 5(1): 61-63.

Matthias MA, Ricaldi JN, Céspedes M, Diaz MM, Galloway RL, Galloway R. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. PLoS Negl Trop Dis. 2008; 2 (4): 213.

Mills J, Childs J, Ksiazek T, Peters CJ. OMS/OPS/CDC. 1998. Métodos para trapeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. EUA: pp: 21-38 (64). Manual en español a cargo de la Representación de la OPS/OMS en Chile.

Miranda L. Estudio serológico de *Leptospira spp* en caninos existentes en explotaciones porcinas en el municipio de Montería, Córdoba. 2008 Trabajo presentado como requisito parcial para optar el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad de Córdoba pp: 31.

Montes AS, Dimas JS, Preciado-Rodríguez FJ. Rats and dogs: important vectors of leptospirosis in agricultural areas in Ciudad Guzmán, Jalisco. Rev Cub Med Trop. 2002; 54(1):21-3.

Moore GE, Guptill LF, Glickman NW, Caldanaro R, Aucoin D, Glickman LT. Canine Leptospirosis, United States, 2002–2004. Emerg Infect Dis. 2006; 12(3): 501-503.

Morales-Cabeza RJ, Bravo-Tamayo D, Moreno-Velázquez D, Góngora A, Ocampo A. Asociación serológica de la infección por *Leptospira* en humanos, porcinos y roedores en una granja de Villavicencio-Colombia. Revista Orinoquía-Universidad de los Llanos. 2007; 11 (2): 73-80.

Morales GA, Guzmán VH, Beltrán LE. Leptospirosis in Colombia: isolation of *Leptospira* spp from the kidneys of brown rats (*Rattus norvegicus*) trapped on infected piggeries. Trop Anim Health Prod. 1978; 10(2):121-3.

Murray GL, Srikrum A, Hoke DE, Wunder EA, Lo M, Zhang K. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. USA. Infect Immun. 2009; 77(3): 952–958.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Taxonomy Browser. Fecha de consulta: 20 de abril de 2011. Disponible en: <http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/WWWtax.cgi?mode=Tree&id=170&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.

Navarrete MG, Sejin RC, Vélez PR. Estudio preliminar de leptospirosis en caninos de la ciudad de Montería, Colombia. Rev ICA. 1981; 16 :165-172.

Nervig RM, Garrett LA. Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. Am J Vet Res. 1979; 40(8):1197-1200.

Ochoa JE, Sánchez A, Ruíz A. Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. Panam Salud Pública/Pan Am J Public Health. 2000; 7(5): 325-331.

OMS/OPS/VP. Leptospirosis Humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. 2008. Traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. - Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa : 1-121.

Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, Thinkamrop A, Susaengrat W. Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. Clin Infect Dis. 2003; 36:1507–13.

Pérez- García. Hallazgos histopatológicos en necropsias de leptospirosis. Col Med. 1997; 29: 43-46.

Perolat P, Chappel RJ, Adler B. Baranton G, Bulacht M, Billingham M. L. et al. *Leptospira fainei* spp nov, isolated from pigs in Australia. Int J Syst Bacteriol. 1998; 48: 851-858.

Pezzela M, Lillini E, Sturchio E, Lerardi LA, Grassi M, Traditi F et al. Leptospirosis survey in wild rodents living in urban areas of Rome. Ann Ig. 2004; 16 (6) : 721-6.

Prescott JF, Mc Ewen B, Taylor J, Woods JP, Ogg A, Wilcock B. Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. Can Vet J. 2002; 43: 955-961.

Priya CG, Hoogendijk KT, Berg M, Rathinam SR, Ahmed A, Muthukkaruppan VR et al. Field rats form a major infection source of leptospirosis in and around Madurai. India. J Postgrad Med. 2007; 53(4): 236-40.

Rahelinirina S, Léon A, Harstskeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C et al. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* spp in Madagascar. PLoS ONE. 2010; 5 (11): e14111.

Rodríguez AL, Ferro BE, Barona MX, Santafé M. Evidencia de Exposición a *Leptospira* en perros callejeros de Cali. Biomédica. 2004; 24: 291-5.

Rodríguez-Martínez G. Estado actual de la leptospirosis. ICA - CEISA, Bogotá DC. MVZ-Córdoba. 2000; 5 (1): 61-63.

Rohrbach BW, Ward DA, Hendrix DV, Cawrse-Foss M, Moyers TD. Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent uveitis. Vet Ophthalmol. 2005; 8(3):171-9.

Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. Eur J Clin Microbiol and Infect Dis. 2010; (10): 1305-9.

Romero MP, Sánchez J. Seroprevalencia de la leptospirosis canina de tres municipios del departamento de Tolima, Colombia. Rev. MVZ-Córdoba 2009; 14 (2): 1684-1689.

Romero-Vivas CME, Vargas MI, Falconar AK. Presentación clínica de pacientes infectados con diferentes serotipos de *Leptospira interrogans* en Barranquilla en los años 2000, 2007, 2008 y 2009. Colombia. Biomedica. 2009; 29 Supl.197-215: 200-201.

Romero-Vivas CM, Arango-Padilla P, Falconar AK. Pupal-productivity surveys to identify the key container habitats of *Aedes aegypti* (L.) In Barranquilla, the principal seaport of Colombia. Ann Trop Med Parasitol. 2006; 1: 87-95.

Rubel D, Seijo A, Cernigoi B, Viale A, Wisnivesky-Colli. *Leptospira interrogans* en una población canina del Gran Buenos Aires: variables asociadas con la seropositividad. Revista Panamericana de Salud Pública. 1997; 2 (2): 102-5.

Sanders E, Rigau-Pérez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, Aye T, et al. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1966. Am J Trop Med Hyg. 1999; 61(3): 399–404.

Saravanan R, Rajendran P, Thyag G. Clinic, bacteriologic and histopatologic studies on induced leptospirosis in stray dogs pups. Indian J Pathol Microbiol. 1999; 42 (4): 463-469.

Schreiber P, Martin V, Najbar W, Sanquer A, Gueguen S, Lebreux B. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination. Vet Microbiol. 2005; 108:113–118.

Seijo A, Coto H, San JJ, Videla J, Deodato B, Cernigoi B, et al. Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis. 2002; 8 (9):1004-5.

Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt A, et al. *Leptospira wolffii* sp nov., isolated from a human with

suspected leptospirosis in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58: 2305–2308.

Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwal AG, et al. *Leptospira kmetyi* sp. nov, isolated from an environmental source in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009; 59: 705-708.

Silva-Molano RF, Castro F, Montoya JM, Loaiza-Echeverry AM. Estudio de Seroprevalencia de leptospirosis canina en Manizales-Colombia, mediante aglutinación microscópica (MAT). *Rev. Vet Zoot Univ de Caldas*. 2008: 35-39.

Silva RF, Riedemann S. Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch Med Vet*. 2007; 33 (9): 269-274.

Silverman MS, Aronson L, Eccles M, Eisenstat J, Gottesman M, Rowsell R, et al. Leptospirosis in febrile men ingesting *Agouti paca* in South America. *Ann Trop Med Parasitol*. 2004; 98 (8): 851-9.

Sociedad Portuaria Regional de Barranquilla-SPRB. Fecha de consulta: noviembre 10 de 2009. Disponible en: <http://www.sprb.com.co>

Songer JG, Chilelli CJ, Reed RE, Trautman RJ. Leptospirosis in rodents from an arid environment. *Am J Vet Res*. 1983; 44 (10): 1973-6.

Suepaul SM. Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. *Epidemiol Infect*. 2009; 137: 1586-1592.

Surujballi O, Mallory M. An indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple *Leptospira* serovars. *Can Vet J*. 2004; 68 (1):1–6.

Thiermann AB, Frank RR. Human leptospirosis in Detroit and the role of rats as chronic carriers. *Int J Zoon*. 1980; 7: 62-72.

Thiermann AB. Canine leptospirosis in Detroit. *Am J Vet Res*. 1980; 41:1659-61.

Trevejo R, Rigau-Pérez J, Ashford D, McClure E, Gonzalez C, Amador A, et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage. Nicaragua, 1995. J Infect Dis, 1998; 17 (5): 1457-63.

Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. Prev Vet Med. 2003; 60 (3): 227–235.

Vinetz JM. Leptospirosis is everywhere, just have to know what to look for. But how? swiss med weekly. 2004; 134 (23-24): 331 – 332.

Vinetz JM. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 2001; 14: 527–538.

Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. Ann Intern Med. 1996; 125: 794-8.

Vivian JP, Beddoe T, McAlister AD, Wilce Matthew CJ, Zaker-Tabrizi L, et al. Crystal structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic leptospira spp. J Mol Biol. 2009; 387:1229–1238.

Ward MP. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. Prev Vet Med 2002; 56: 203-213.

Webster JP, Ellis WA, McDonald DW. Prevalence of *Leptospira* spp in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. Epidemiol Infect. 1995; 114: 195-201.

World Health Organization. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003; Geneva:1-109.

WHO/FAO/OIE. Leptospirosis. 2008. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure: 1- 17.

Zhijun W, Jin L, Węgrzyn A. Leptospirosis vaccines. Microb Cell Fact. 2007; 6:39.

Anexo 1 Consentimiento escrito para aceptar colocar trampas de roedores en la residencia

Me ha sido comunicado que este proyecto de investigación consiste en la búsqueda de la bacteria llamada *Leptospira*, la cual se puede encontrar en roedores y afectar la salud de los humanos y de los perros. Esta bacteria puede causar en humanos síntomas tales como fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares, escalofrío, rigidez en la nuca (parecido a una meningitis, erupciones en la piel, náusea, vómito, conjuntivitis y postración; así mismo que esta enfermedad puede ser severa afectando hígado, riñones, corazón, pulmones, presentándose hemorragias e ictericia; algunas veces produce encefalitis. Autorizo a las autoridades de salud y al personal del grupo de investigaciones a que coloquen trampas en mi casa y las revisen diariamente hasta que un roedor sea capturado (esto puede durar hasta tres días). Me ha sido informado también que esos roedores serán llevados al laboratorio del Grupo de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte, quienes realizarán pruebas para detectar la infección. Yo también acepto cuidar de la trampa para que no sea dañada o desechada por los miembros de la familia.

Yo he recibido toda la información arriba dada y he tenido la oportunidad de preguntar sobre cualquier inquietud que tenga. Todas mis preguntas han sido respondidas a mi entera satisfacción. Yo acepto voluntariamente participar en este estudio y entiendo que tengo el derecho a no permitir la entrada de personal a la casa en el momento que yo desee, sin que esto afecte de forma alguna a mi persona o a mi familia.

Yo entiendo que la información arriba dada será mantenida de manera confidencial.

Firmada por -----

Número de identificación -----

Fecha-----

Lugar-----

Dra. Claudia M E Romero-Vivas. Grupo de Investigaciones en Enfermedades Tropicales. Universidad del Norte, Km 5, antigua vía a Puerto Colombia.

Anexo 2

[illegible]

ANEXO 3. FORMULARIO DE NECROPSIA EN ROEDORES

PROYECTO: LEPTOSPIROSIS

BARRIO:

[illegible]

Anexo 4. Consentimiento escrito para toma de muestras en perros

Me ha sido comunicado que este proyecto de investigación consiste en la búsqueda de infección producida por bacterias llamadas leptospirosis, las cuales pueden causar síntomas en mis perros, tales como anorexia, vómito, diarrea, congestión nasal/ocular, espalda encorvada e ictericia. O tal vez no lo enfermen. También me ha sido informado que esta enfermedad puede presentarse en humanos. Autorizo que un veterinario tome muestras de sangre y orina a mi perro, las cuales serán llevadas al laboratorio de Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte, quienes realizarán las pruebas para detectar o no la infección. Yo también acepto contestar las preguntas que me formulen respecto a lo que he observado en mi perro.

Yo he recibido toda la información arriba dada y he tenido la oportunidad de preguntar sobre cualquier inquietud que tenga. Todas mis preguntas han sido respondidas a mi entera satisfacción. Yo acepto voluntariamente participar en este estudio y entiendo que tengo derecho a retirarme del mismo sin que de forma alguna afecte a mi persona o a mi familia.

Yo entiendo que la información arriba dada será mantenida de manera confidencial

Dueño del perro-----

Número de identificación-----

Fecha -----

Lugar-----

Para información adicional contactaré a las autoridades de salud:

Dra. Elsa de Plata en la oficina de Salud Pública de Barranquilla. Carrera 41 N° 54-31. Tel: 3106524229 o la Dra. Claudia M E Romero-Vivas. Grupo de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad del Norte, Km 5 antigua vía a Puerto Colombia. Tel: 3509478

ANEXO 5 . Información clínica y epidemiológica de perros, adaptado de WHO, 2003 y basados en Faine, 1999.			
Raza	Nombre	SexoM/F	Edad:
Dirrección de Residencia			
Barrio			
Nombre Veterinario			
Codigo			
Sano: S/N			
Si enfermo : Fecha aparición de sintomas			
Fecha tratamiento de antibiótico			
antibiótico			
Detalles clínicos			
		Tipo de espécimen colectado	Fecha de colección
Espalda arqueada			
Movimiento reluctante			
Urina con sangre			
Vomito			
Riñones inflamados y Balndos			
Vomito			
Depresión			
Fiebre		Contactos con otros animales	
Heces con sangre		enfermos	Si/No
Icteria		cuál	
Muerte			
Otro, especifique			
No sintomas			
Para uso de laboratorio unicamente			
Prueba aplicada	Si/No	Resultado	
Cultivo Leptospira			
PCR			
PFGE (especie)			
MAT	Titulo para 1		
Serogrupo	Muestra		
Serovar			

Anexo 6

Resultados generales obtenidos en la Prueba de Microaglutinación (MAT) con serovares patógenos de <i>Leptospira</i> en roedores																					
Áreas	Anhoa	Ballum	Bankinang	Bataviae	Bratislava	Canicola	Cynopteri	D'jasiman	Georgia	Grippytyphosa	Hebdomadis	Hurstbridge	Icterohaem.	Lousiana	Panama	Ranarum	Robinsoni	Sarmin	S. Hardjo	S. Jin	Vughia
Barrio Americas																					
Nº3 <i>M.musculus (M)</i>	-	-	-	NS	NS	01:20	-	-	-	01:20	01:20	-	01:10	01:20	NS	NS	-	-	NS	NS	-
Nº6 <i>M.musculus (H)</i>	NS	-	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1::80	NS	01:10	01:10	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS	-
Nº17 <i>M.musculus (H)</i>	NS	01:20	1::20	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	01:20	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-
Nº19 <i>M.musculus (H)</i>	NS	-	-	NS	NS	01:05	NS	NS	01:10	01:40	NS	01:05	-	NS	NS	NS	NS	01:20	NS	NS	-
Nº20 <i>M.musculus (H)</i>	-	-	-	NS	01:20	01:20	-	-	NS	01:20	-	-	-	-	01:40	NS	01:40	-	NS	NS	-
Nº21 <i>R. rattus (H)</i>	NS	-	-	-	-	-	-	01:05	-	-	NS	-	-	NS	-	01:20	-	-	-	01:40	-
Barrio Por fin																					
Nº5 <i>M.musculus(H)</i>	-	-	-	NS	NS	-	-	-	-	01:05	-	-	1::80	-	NS	NS	NS	-	NS	NS	-
Nº6 <i>Mus musculus(H)</i>	NS	-	-	NS	NS	-	NS	NS	-	01:40	NS	-	-	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS	-
Nº15 <i>R.rattus (M)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nº 20 <i>R.rattus(M)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	1::160	-	-	-	-	-	NS	-	-	NS	NS	-
Barrio Rebolo																					
Nº4 <i>M.musculus(M)</i>	-	01:40	-	NS	1::80	01:40	01:10	NS	01:40	01:20	01:20	-	1::80	01:20	01:40	01:40	01:40	-	01:05	-	-
Nº 5 <i>M.musculus(M)</i>	NS	01:05	-	NS	-	01:10	01:10	NS	NS	01:05	NS	-	01:20	NS	-	NS	-	-	NS	NS	-
Nº7 <i>R.rattus(H)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01:10	-	-	01:05	-	-	-	-	-
Nº9 <i>M.musculus(H)</i>	NS	-	-	NS	-	-	-	NS	NS	-	NS	-	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS	-
Nº11 <i>Mus musculus(H)</i>	NS	01:40	-	NS	-	-	-	-	-	01:20	NS	-	01:40	NS	-	-	-	-	-	01:20	-
Nº13 <i>R.novergicus(H)</i>	-	-	-	-	01:40	-	01:10	-	-	01:05	01:05	-	01:20	-	-	01:10	-	-	01:20	01:05	-
Nº14 <i>M.musculus(H)</i>	NS	-	-	NS	01:10	01:20	-	-	01:40	01:20	NS	-	-	NS	01:10	01:10	-	-	01:20	01:05	-
Nº 17 <i>M.musculus(M)</i>	-	-	-	NS	-	-	-	NS	NS	-	NS	-	-	-	-	NS	-	-	NS	NS	-
Nº20 <i>M.musculus(H)</i>	-	01:10	-	NS	-	01:40	01:10	-	01:20	01:20	01:20	-	01:10	-	-	01:10	-	-	01:40	01:40	-
Nº21 <i>M.musculus (H)</i>	01:05	-	-	NS	NS	01:40	-	NS	NS	-	01:05	01:10	-	01:10	NS	NS	-	-	NS	NS	-
Nº 23 <i>M.musculus (M)</i>	-	-	-	NS	-	01:20	-	-	-	-	01:05	-	-	-	-	01:10	-	-	-	-	-
UNINORTE																					
Nº 18 <i>D.marsupialis (H)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	01:05	-	-	-	-	01:20	-	-	-	-	-	01:05	-
NS: no se disponia de suero por agotamiento del mismo. (-) Aglutinación <input type="checkbox"/> 50% de leptospiras aglutinadas																					

Anexo 7

Resultados positivos de MAT serovar-específica en la dilución más alta del suero en roedores										
Áreas	Ballum	Bratislava	Canicola	Georgia	Grippytyphosa	Icterohaem.	Panama	Robinsoni	S. Hardjo	S. Jin
Barrio Americas										
Nº3 M.musculus (M)										
Nº6 M.musculus (H)					1::80					
Nº17 M.musculus (H)										
Nº19 M.musculus (H)					01:40					
Nº20 M.musculus (H)							01:40	01:40		
Nº21 R. rattus (H)										01:40
Barrio Por fin										
Nº5 M.musculus(H)						1::80				
Nº6 Mus musculus(H)					01:40					
Nº15 R.rattus (M)										
Nº 20 R.rattus(M)					1::160					
Barrio Rebolo										
Nº4 M.musculus(M)	01:40	1::80	01:40	01:40		1::80	01:40	01:40		
Nº 5 M.musculus(M)										
Nº7 R.rattus(H)										
Nº9 M.musculus(H)										
Nº11 Mus musculus(H)	01:40					01:40				
Nº13 R.novergicus(H)		01:40								
Nº14 M.musculus(H)				01:40						
Nº 17 M.musculus(M)										
Nº20 M.musculus(H)			01:40						01:40	01:40
Nº21 M.musculus (H)			01:40							
Nº 23 M.musculus (M)										

Anexo 8

Resultados generales obtenidos en la prueba de Microaglutinación (MAT) con serovares patógenos de <i>Leptospira</i> en caninos																								
Barrios	Anhoa	Ballum	Bankinang	Bratislava	Bataviae	Canicola	Cynopteri	D'jasiman	Georgia	Grippotyphosa	Hebdomadis	Hurstbridge	Icterohaem.	Lousiana	Manhao	Panama	Pomona	Robinsoni	Ranarum	Sarmin	S.hardjo	Serjoe jin	Shermani	Vughia
Americas																								
Dog 10 (H)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:1600	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 13 (M)	(-)	(-)	1:100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:800
Dog 20 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:100
Dog 21 (H)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:200
Dog 22 (H)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 23 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 24 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Por Fin																								
Dog 24 (M)	(-)	(-)	1:1600	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:400	(-)	(-)	1:50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:50
Dog 25 (M)	(-)	(-)	1:1400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:200
Dog 28 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:100
Rebolo																								
Dog 2 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:800	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 3 (H)	(-)	1:50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:400	(-)	(-)	1:400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:400	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 4 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:100	(-)	(-)	1:200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:50	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 6 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 7 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 9 (H)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 10 (H)	(-)	1:100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:800	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 11 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 12 (H)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 13 (H)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 14 (H)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:800	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 15 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:100
Dog 16 (IM)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:25600	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:200
Dog 18 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:6400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:200
Dog 20 (H)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:800	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dog 24 (M)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:3200	1:100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Anexo 9

Resultados positivos de MAT serovar-especifica en la dilución mas alta de sueros caninos									
Barrios	Bankinang	Canicola	Grippotyphosa	Hurstbridge	Icterohaem.	Lousiana	Sarmin	Vughia	Signos/síntomas
<u>Americas</u>									
Dog 10 (H) *				1::1600					Espalda arqueada, vomito y depresion
Dog 13 M*								1::800	Riñones inflamados
Dog 20 M*								1::100	Espalda arqueada y depresion
Dog 21 (H)*								1::200	Espalda arqueada
<u>Por fin</u>									
Dog 24 M*	1::1600								Riñones inflamados
Dog 25 M*	1::400			1::400		1::400			Espalda arqueada, heces con sangre
Dog 28 M*									Fiebre
<u>Rebolo</u>									
Dog 2 M			1::800						
Dog 3 (H)*			1::400		1::400		1::400		Fiebre
Dog 4 (M)*					1::200				Fiebre
Dog 6 (M)*					1::100				Espalda arqueada
Dog 7 (M)*					1::400				Fiebre
Dog 9 (H)									
Dog 10 (H)*					1::800				Ictericia
Dog 11 (M)									
Dog 12 (H)									
Dog 13 (H)									
Dog 14 (H)						1::800			
Dog 15 (M)*								1::100	Vomito
Dog 16 ((M)						1::25600			
Dog 18 (M)*						1::6400			Vomito
Dog 20 (H)		1::800							
Dog 24 (M)*				1::3200					Fiebre
* Caninos que presentaron características clínicas									

Anexo 10

De éstos, 61% correspondía al sexo femenino y 39% al masculino, con edades entre 16 meses y 70 años; predominaron los pacientes entre 14 y 45 años, seguidos de pacientes pediátricos (1 a 14 años) con 33% (12/33) de los casos y cuyas ocupaciones fueron, principalmente, estudiantes (68%) y amas de casa.

Los síntomas y signos que se presentaron con mayor frecuencia fueron: fiebre (88%), cefalea (84%) y mialgias (75%); se presentaron náuseas, vómitos y escalofríos en 58% de la población afectada, artralgias en 55% y dolor ocular en 52%. La ictericia se presentó en dos pacientes (6%), uno de los cuales presentó síndrome de Weil y falleció. El 22% de los pacientes con hemograma (23) presentaron leucocitosis-neutrofilia y leucopenia-linfocitosis en 22% cada uno.

Los serotipos patógenos diagnosticados fueron Bratislava (7/33), Icterohaemorrhagiae (5/33), seguida de Samín (5/33), Vughia (4/33), Robinsoni (4), Autumnalis, Canicola y Pomona (2/33) cada una, Ballum, Grippotyphosa (1/33) cada una. Al paciente que falleció, sólo se le pudo tomar una muestra, la cual fue positiva para el serovar Vughia, con un título de 1:3.200. Como factores de riesgo, se identificaron el contacto con ratas y ratones, y la presencia de arroyos.

Serovariedades de *Leptospira* patógena que afectan a la población canina en áreas de alto riesgo de infección en Barranquilla

Margarett Cuello, Andrew Falconar, Claudia Romero-Vivas

Grupo de Investigación en Enfermedades Tropicales, Departamento de Medicina Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

Introducción. La leptospirosis es una enfermedad infecciosa reemergente que se presenta en zonas rurales y urbanas del mundo, producida por espiroquetas de la especie patógena *Leptospira interrogans*, la cual presenta más de 200 serotipos diferentes. Las actividades que se asocian con la exposición a animales o recreacionales representan un factor de riesgo importante para adquirir la infección, apareciendo cuadros clínicos que van de leves a graves e, incluso, que pueden producir la muerte.

El hombre y otros animales se pueden infectar en forma directa por contacto de las mucosas o la piel lesionada con las leptospirosis presentes en la orina

y, en forma indirecta, al ingerir agua y alimentos contaminados. En la transmisión urbana, los perros son una fuente de infección importante para los humanos.

Materiales y métodos. Se recolectaron 83 muestras de población canina por venopunción y cistocentesis. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente y se procesaron antes de dos horas. El sedimento obtenido de las orinas se filtró y diluyó para ser cultivado en los medios EMJH y Fletcher. Los sueros obtenidos se almacenaron a -85°C para posterior realización de microaglutinación con serovar Patoc. Los sueros positivos se enfrentaron a un panel de 24 diferentes serotipos patógenos.

Resultados. El 31,3% (26/83) de los sueros se aglutinaron con antígenos específicos de género de *Leptospira*, de los cuales, 76,9% (20/26) presentó aglutinación con serotipos patógenos específicos y, de éstos, 55% (11/20) se acompañó de características clínicas. El serotipo más frecuente en todas las áreas estudiadas fue Vughia, 45% (9/20), con títulos desde 1:50 hasta 1:800. Con igual porcentaje (45%) y títulos se encontró el serotipo Icterohaemorrhagiae, y se halló solamente en dos de las áreas estudiadas. En orden de frecuencia, siguió el serotipo Hurstbridge (serogrupo Fainei), 30% (6/20), con títulos de 1:50 hasta 1:3.200, seguido del serotipo Louisiana, 25% (5/20), con títulos desde 1:25 hasta 1:25.600.

Por barrios, el porcentaje de perros positivos en el barrio las Américas fue de 15,4% y se encontraron los serotipos Hurstbridge, Bankinang, Icterohaemorrhagiae y Vughia, de los cuales el más frecuentemente aglutinado fue Hurstbridge y, su título más alto, 1:1600. En el barrio Por Fin, el porcentaje de perros positivos fue 10% frente a los serotipos Bankinang, Vughia, Hurstbridge, Mini, Bataviae y Louisiana; el más aglutinado fue Vughia, con títulos de 1:200; sin embargo, el título más alto, 1:1600, lo presentó el serovar Bankinang. En Rebolo, circula el mayor número de serotipos: Grippotyphosa, Samín, Ballum, Icterohaemorrhagiae, Louisiana, Vughia, Canicola y Hurstbridge. El más frecuente fue Icterohaemorrhagiae, con títulos hasta 1:800, pero el serovar Louisiana presentó los títulos más altos (1:25.600).

De los perros que presentaron manifestaciones clínicas, 25% mostró espalda arqueada; 5%, sangre en la orina; 15%, vómito; 10%, riñones inflamados; 10%, depresión; 5%, heces con sangre, y 5%, ictericia, lo cual se correlaciona mayoritariamente con los serotipos Vughia y Hurstbridge. A la fecha no se ha obtenido aislamientos de los cultivos de orina.